Über die Reaktionsfähigkeit des Schwefels in Cystinderivaten und Eiweißstoffen unter besonderer Berücksichtigung des Keratins der Schafwolle

*

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt am 31. I. 1939 von

Paul Rambacher
aus Würzburg

1939
Buchdruckerei Fritz & Rappert Nachfolger, Inhaber Anton Weltz, Ochsenfurt a. M.

Berichterstatter: Dozent Dr. A. SCHÖBERL
Professor Dr. F. G. FISCHER

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet!

INHALT DES THEORETISCHEN TEILES.

Seite

1. Chemismus der Abspaltung von H_2S aus Cystinderivaten mit Alkali und der Einfluß des Cystineinbaues 7
2. Deutung der Alkaliinaktivierung von Insulin 14
3. Zusammensetzung und Struktur des Keratins der Schafwolle . . . 15
4. Über den Schwefelgehalt der Schafwolle 18
5. Die Deutung der Angreifbarkeit des Wollekeratins durch Alkali und Wasser 27
6. Eine exakte Methode zum Nachweis von Schädigungen an Haaren und Wollen 31
7. Ausblicke auf Struktur und Festigkeit von Keratinfasern in theoretischer und praktischer Hinsicht 33

INHALT DES EXPERIMENTELLEN TEILES.

1. Colorimetrische Bestimmung von Cystin und Cystein mit 9 (18) Wolframsäure-Phosphorsäure 35
2. Bestimmung von Cystin und Schwefel in Schafwolle 41
3. Einwirkung von Alkalien auf Cystinderivate 49
4. Einwirkung von Alkalien auf Insulin und Metakeratin 62
5. Angreifbarkeit des Wollekeratins durch Alkali und Wasser . . . 63
6. Nachweis von Schädigungen an Haaren und Wollen 71
7. Trennung und Isolierung der Aminosäuren aus Schafwolle . . . 72

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543516_0020

Theoretischer Teil.

1. Wie eine große Reihe von Arbeiten in der letzten Zeit zeigen, wird von den verschiedensten Autoren dem Schwefel in organischen Molekülen immer größere Bedeutung zuerkannt. Es gibt jedoch nur wenig Möglichkeiten, in denen das organisch gebundene Schwefelatom auftreten kann. Unter diesen stellt wohl die Disulfid (SS)-Bindung im Molekülverband des Cystins das reaktionsfähigste und damit interessanteste System dar. Zwei Grundtypen von Reaktionen sind für die Angreifbarkeit der SS-Bindung im Cystinmolekül kennzeichnend, die auch dann noch Gültigkeit haben, wenn das Cystinmolekül ganz oder teilweise in eine Peptidkette eingebaut ist. Einerseits läßt sich die Disulfidbrücke reduktiv spalten, sei es durch aktiven Wasserstoff, oder sei es durch andere SH-Verbindungen mit höherem Reduktionspotential (Thioglykolsäure). Dabei ist es nicht gleichgültig, wie die SH-Gruppe eingebaut ist, denn *Schöberl* und *Krumey*[1]) konnten zeigen, daß Cystein, Cysteinderivate (SH-Glutathion) und Isocystein bei gleichem p_H verschiedenes Reduktionsvermögen gegen 9 (18)-Wolframsäure-Phosphorsäure (als WPhS abgekürzt) besitzen. Andererseits läßt sich die Disulfidbrücke hydrolytisch angreifen, ein Vorgang, der schon bei einem p_H um 6 beginnt und mit steigendem p_H beträchtlich zunimmt. *Schöberl* und *Eck*[2]) untersuchten diese Verhältnisse für einfache Disulfidkarbonsäuren, in denen die SS-Brücken α-ständig zur COOH-Gruppe auftraten, gingen dann zu β-Disulfidkarbonsäuren (Dithiodihydracrylsäure) über, um mit dem Studium des Cystins und seiner Derivate Anschluß an wichtige physiologische und technische Fragen zu gewinnen. *Schöberl* und *Eck*[2]) hatten eindeutig bewiesen, daß bei der Einwirkung von Alkali auf α-Disulfidkarbonsäuren und in bedingtem Ausmaße auch bei β-Disulfidkarbonsäuren der Primäreffekt in einer hydrolytischen Aufspaltung der SS-Bindung zu suchen ist. Die hierbei entstehenden Spaltstücke bestehen aus Sulfensäure und Merkaptan. Als Reaktionsschema gilt:

$$R—S——S—R + HOH \rightleftharpoons RSH + RSOH$$

Schon Dithiodihydracrylsäure als β SS-Corbonsäure erwies sich weitaus beständiger als α SS-Carbonsäuren. Es war also mit Recht im Falle des freien Cystins zu vermuten, daß eine Durchspaltung weitaus langsamer verlaufen

[1]) *A. Schöberl* und *F. Krumey*, B. 2361 (1938).
[2]) *A. Schöberl* und *H. Eck*, A. 522, 97 (1936).

mußte als etwa im Falle der Dithiodiglykolsäure. Als äußeres Zeichen der erfolgten Spaltung galt die Entstehung von H_2S, der nach *Schöberl* aus der in einer Sekundärreaktion zerfallenden Sulfensäure stammen sollte. Zieht man bei der an sich schon unbeständigen Sulfensäure noch den auflockernden Einfluß der α-ständigen COOH-Gruppe in Betracht, so ist es unter den gegebenen Versuchsbedingungen durchaus möglich, daß der Zerfall der Sulfensäure sehr schnell verläuft und die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion die hydrolytische Aufspaltung der SS-Brücke bleibt. Beim Übergang von den α- zu den β-Disulfidkarbonsäuren nimmt die Abspaltung von H_2S sehr stark ab. *Schöberl* und *Hornung*[3]) erhielten bei der Spaltung von Cystin mit Alkali nur kleine Mengen von H_2S. Nun läßt sich aber die H_2S-Menge nicht in allen Fällen als ein Maß der primär verlaufenden Reaktion ansehen. *Schöberl* und *Hornung* bestimmten dann auch die andere primäre Spaltkomponente, die SH-Verbindung, quantitativ. Dabei traten Widersprüche auf zu dem von *Schöberl* geforderten Zerfall der Sulfensäure in H_2S und Brenztraubensäure. Neben 41,7% Cystein wurden nur 8,7% H_2S gefunden, während die Theorie ebenfalls 41,7% H_2S fordert. Dieser Befund fand dann auch keine weitere Deutung, da das Versuchsmaterial noch nicht ausreichte. Noch schärfer wurden die Gegensätze, als die Alkalispaltung von *Cystinhydantoin, Dikarbobenzoxy-Cystinyldiglycin* und *SS-Glutathion* zwar H_2S aber keine SH-Verbindung lieferte. Dabei fiel noch in den genannten Versuchen die Abspaltung von elementarem Schwefel auf. Eigentümlich war das Verhalten von *Dialanylcystin* und *Diformylcystin,* bei denen zwar die SH-Verbindung bestimmt wurde, aber neben H_2S der in der Theorie von *Schöberl* nicht vorgesehene elementare Schwefel auftrat. *Schöberl* und *Hornung* grenzten damals die Annahme der *hydrolytischen Aufspaltung* scharf ab von dem von Bergmann und Stather[4]) diskutierten Spaltungsmechanismus, den sie nur für cyclische Cystinderivate noch gelten ließen. Dem SS-Glutathion gegenüber nahmen sie eine abwartende Haltung ein. Mit der *Bergmann*'schen Auffassung konnte man die Entstehung des elementaren Schwefels bzw. das Fehlen des SH-Körpers erklären. *Bergmann* glaubt an folgendes Spaltschema:

$$[HOOC—CH(NH_2)—CH_2—S]_2 \rightleftarrows 2\ CH_2=C(NH_2)—COOH + H_2S + S$$

Diese Anschauungen wurden am *Dialanyl-cystindianhydrid* entwickelt. Es scheint reichlich gewagt, an einer einzigen Modellsubstanz mit noch dazu speziellem Charakter eine Theorie abzuleiten und diese dann auf alle SS-Systeme zu übertragen, vor allem wenn man bedenkt, daß die *Bergmann*'schen Versuche nur qualitativen Charakter tragen.

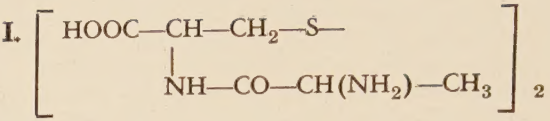
Bevor man zu den komplizierten cystinhaltigen Verbindungen überging, war es nötig, erst über den Verlauf der Spaltung bei freiem Cystin ein möglichst klares Bild zu erlangen. Die Versuche ergaben folgendes:

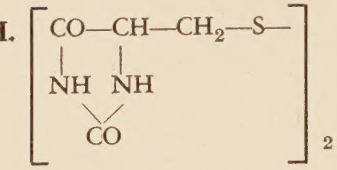
[3]) *A. Schöberl* und *Th. Hornung,* A. 534, 210 (1938).
[4]) *M. Bergmann* und *F. Stather,* H. 152, 189 (1926).

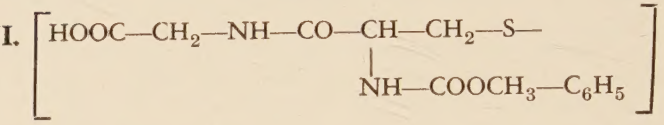
Cystein tritt bis zu einer Menge von 50% des angewandten Cystins auf, es kann also nur durch Hydrolyse der SS-Bindung entstehen. In der anderen Molekülhälfte war eine höher oxydierte Schwefelform anzunehmen. Die geringe H_2S-Abspaltung macht einen Zerfall der Sulfensäure sehr unwahrscheinlich. Im übrigen steht ja in diesem Falle die SOH-Gruppe in β-Stellung zur COOH-Gruppe, so daß deren auflockernder Einfluß nicht in Frage kommt. Es erschien also nicht aussichtslos, durch Variation der Versuchsbedingungen (Temperatur) die H_2S-Entwicklung ganz zu verdrängen. Für eine Spalttemperatur von 60° und n-NaOH finden sich die Ergebnisse in Tafel 1. Zur Schonung der SH-Verbindung bei der Alkalispaltung erschien es zweckmäßig, von einem leichter spaltbaren Cystinderivat auszugehen. Man wählte das *Dialanyl-cystin* (I), das ja zudem noch den merkwürdigen Befund der Schwefelabscheidung zeigte. Das Spaltergebnis für 80° und mit n-NaOH zeigt Tafel 1. Schon nach 15 Minuten wurden hier, nachdem etwa die Hälfte des Substrates gespalten war, 21,4% der SH-Verbindung gefunden, während der H_2S-Wert im Verhältnis sehr klein blieb (4,11%). Mehr und mehr trat jetzt die Tatsache in den Vordergrund, daß der Schwefelwasserstoff entweder *gar nicht* oder nur in kleinem Umfang aus der Sulfensäure stammen konnte. Dagegen ließ sich aus diesen wenigen Versuchen, im Vergleich mit den von *Schöberl* und *Hornung* gefundenen Werten schon sagen, daß eine Erhöhung der H_2S-Menge mit einem Abfallen des SH-Wertes parallel geht. In erster Linie war an einen entscheidenden Einfluß der Spalttemperatur zu denken. Unter diesen Voraussetzungen schien es also aussichtsreich zu sein, durch Wahl der geeigneten Temperatur und in manchen Fällen auch der Reaktionsdauer, bei den Beispielen SH-Gruppen zu fassen, für die *Schöberl* und *Hornung* noch den Spaltungsmechanismus nach *Bergmann* annahmen, bzw. diskutierten. Bei der Spaltung von *Dikarbobenzoxy-cystinyldiglycin* (III) bei 40° und mit n-NaOH (Tafel 1) zeigt sich eine überaus leichte Aufspaltbarkeit der SS-Brücke und eine gleichzeitige große Labilität der SH-Verbindung, die dann unter H_2S-Entwicklung zerfällt.

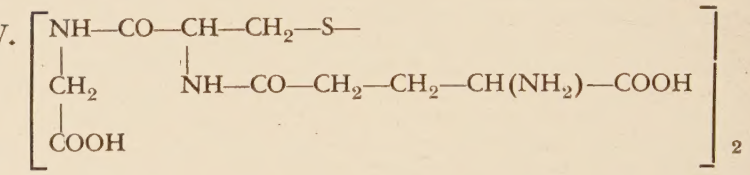
Präparat	*Cystin*		*Dialanyl-cystin*	*Dikarbobenzoyx-cystinyldiglycin*
Spalttemperatur	60	60	80	40
Alkali	n	n	n	n
Spaltzeit in Stunden	1,5	8,25	0,25	0,25
NH_3 in % der Theor.	0	4,3	—	—
H_2S in % der Theor.	0	0,04	4,11	14,4
SH in % der Theor.	7,5	23,2	21,4	25,2
SS in % der Theor.	88,9	48,6	51,9	0
Bilanz	103,9	95,8	102,92	79,2

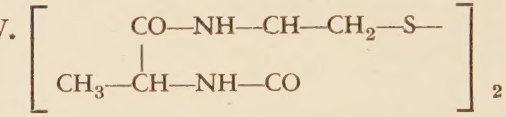
Tafel 1. Spaltung von Cystin, Dialanylcystin und Dikarbobenzoxy-cystinyl-diglycin.











Eindeutig wurde diese Annahme durch die Temperaturabhängigkeit der SS-Glutathionsspaltung (IV) bei einer zweistündigen Spaltzeit und in n-NaOH bewiesen (siehe Tafel 2 und Abb. 1).

Temperatur	*30*	*40*	*50*	*60*	*70*	*80*	*90*	*98*
NH_3 % d. Theor.	0	0,24	8,68	26,8	37,4	55,5	70,5	78,8
H_2S % d. Theor.	2,1	6,7	7,7	16,9	21,8	32,8	46,4	54,5
SH % d. Theor.	51,6	53,3	44,2	37,6	23,3	13,7	5,0	0
SS % d. Theor.	0	0	0	0	0	0	0	0
Bilanz	107,3	120,0	103,8	109,0	90,2	93,0	102,8	109,0

Tafel 2. Temperaturabhängigkeit der SS-Glutathionspaltung (Spaltzeit 2 Std. n-NaOH).

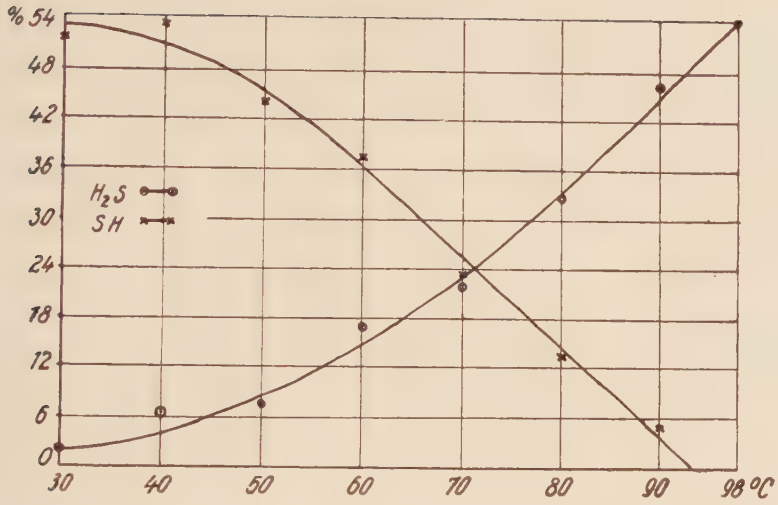


Abb. 1

Über die Beständigkeit und Menge der auftretenden SH-Verbindung des *Cystinhydantoins* (II) orientiert Tafel 3. Damit ließen sich also auch noch die restlichen Modelle in die Theorie der primären hydrolytischen Aufspaltung der SS-Bindung einordnen. Wie man sieht, war es nur eine Frage der günstigsten Versuchsbedingungen und exakter Methoden zur Bestimmung von SH- und SS-Systemen (vergl. Absch. 4), um hier die Entscheidung zu treffen. Es bestand somit kein zwingender Grund mehr, dem von *Bergmann* untersuchten *Dialanyl-cystin-dianhydrid* (V) einen anderen Spaltungsmechanismus zuzuerkennen. Diese Voraussage ließ sich dann auch durch das Experiment bestätigen. Die Ergebnisse der *Dialanyl-cystin-dianhydrid*spaltung finden sich in Tafel 4.

Spaltzeit in Minuten	120	15	15
Alkali	n	0,1-n	0,1-n
Temperatur	40	40	60
NH_3 in % der Theor.	0	0	—
H_2S in % der Theor.	42,5	4,6	11,3
SH in % der Theor.	0	45,1	26,0
SS in % der Theor.	0	0	0
Bilanz	85,0	99,4	74,6

Tafel 3. Spaltung von Cystinhydantoin.

Spaltzeit in Minuten	15	15	15	15	15
Alkali	0,1-n	0,1-n	0,1-n	n	n
Temperatur	40	60	80	40	60
NH_3 in % der Theor.	9,0	—	—	7,79	—
H_2S in % der Theor.	10,18	25,7	42,4	21,4	22,5
SH in % der Theor.	24,1	18,5	7,28	21,75	24,9
SS in % der Theor.	32,3	0	0	0	0
Bilanz	100,8	88,4	99,36	86,3	94,8

Tafel 4. Spaltung von Dialanyl-cystin-dianhydrid.

Auf Grund der Spaltversuche an Cystin und an seinen Abkömmlingen läßt sich also folgendes Bild entwerfen: Der Primärangriff auf SS-Bindungen aller Art ist hydrolytischer Natur, unter Bildung von SH-Verbindungen und Sulfensäure. Bei den α-Disulfidkarbonsäuren ist die SH-Verbindung stabiler. Beim Cystin und seinen Derivaten mit der SH-Gruppe in β-Stellung wächst die Instabilität der SH-Verbindung, wenn im Cystinmolekül NH_2- und COOH-Gruppen fortschreitend substituiert sind. Eine weitere Steigerung der Instabilität tritt noch hinzu, wenn das Cystin in ein Ringsystem eingebaut ist. Wird in diesem Falle die Temperatur zu hoch gewählt, oder der Spaltversuch zu lange ausgedehnt, so zerfällt die SH-Verbindung unter Abspaltung von H_2S, wobei vielleicht eine Methylenverbindung auftreten kann. Auf diesem Wege dürfte auch *Bergmann*[4]) zu der von ihm diskutierten Methylenverbindung bzw. deren polymeren Form gelangt sein. *Bergmann* schreibt in dieser Arbeit selbst, daß das Polymere stets etwas Schwefel enthielt, der nur schwer zu entfernen war und der nach dem eben Gesagten durchaus die in kleinen Mengen vorhandene SH-Verbindung darstellen kann, die schließlich ihren gesamten Schwefel bei wiederholtem Umkristallisieren und Erhitzen abspaltet. Die weitaus größere Stabilität des SH-Glutathions gegen Alkali (vergl. Tafel 5) ist nicht als Einwand gegen diese Auffassung geeignet. *Schöberl* und *Krumey*[22]) konnten zeigen, daß SH-Glutathion im Entstehungszustand (Sulfitspaltung von SS-Glutathion) in der Lage ist, auch bei p_H 5,2 WPhS zu reduzieren. Das primäre Auftreten aktivierter Moleküle ist nicht von der Hand zu weisen. Es ließe sich in diesem Zusammenhang die zellphysiologisch wichtige Frage besonders aktiver Wasserstoffdonatoren diskutieren.

Temperatur	80	90	98
NH_3 in % der Theor.	—	—	18,0
H_2S in % der Theor.	12,3	19,7	43,0
SH in % der Theor.	90,1	82,5	61,0

Tafel 5. Spaltung von SH-Glutathion.

Über das Schicksal der zweiten Spaltkomponente, der Sulfensäure, läßt sich sagen, daß sie in den Fällen des Dialanylcystins, des Diformylcystins, des SS-Glutathions, des Dikarbobenzoxy-cystinyl-diglycins und des Dialanylcystin-dianhydrids unter *Schwefelabscheidung* zerfällt. Im Falle des Cystins ließ sich in Anbetracht der schweren Spaltbarkeit diese Entscheidung nicht mit Sicherheit treffen, doch erscheint es nicht unwahrscheinlich, da die Ammoniakabscheidung im Verhältnis hoch war. Ein Herausbrechen des elementaren Schwefels müßte dann zunächst zu Oxyaminosäuren führen, von denen bekannt ist (speziell im Falle des Serins), daß sie sich unter Ammoniakabspaltung in Brenztraubensäure umwandeln[5]). Es bleibt überhaupt fraglich, ob nicht alle bisher bei der Spaltung von Disulfiden festgelegten Hydrazone der β-Ketosäuren auf diesem Wege entstanden sind. Bei den in dieser Richtung zielenden Versuchen (z. B. Cystin) wurde $Pb(CH_3COO)_2$ zugesetzt, um den Schwefelwasserstoff abzufangen, so daß also auch eventuell auftretender elementarer Schwefel in der alkalischen Lösung unbemerkt als PbS entfernt wurde.

Verläuft der Zerfall der Sulfensäure in der beschriebenen Weise, so mußte es also möglich sein, den Fortschritt der Spaltung aus der *Summe* der H_2S- und SH-Werte zu erkennen (beide in % der Theorie ausgedrückt). An Sulfensäure bzw. elementarem Schwefel müßte die gleiche Menge entstehen. Der Schwefel konnte allerdings aus versuchstechnischen Gründen nicht einwandfrei ermittelt werden. Die Gesamtbilanz einer Spaltung war dann in folgender Weise aufzustellen: $2 \cdot (SH\,\% + H_2S\,\%) + SS\,\% = 100\%$. So sind die in den Tafeln angegebenen Bilanzzahlen zu verstehen. Es zeigt sich in fast allen Fällen hinreichende Übereinstimmung mit der theoretischen Vorstellung. In den komplizierter gebauten Systemen (Dialanylcystindianhydrid) ist es nicht ausgeschlossen, daß sich ein Teil der SH-Gruppen der Bestimmung entzieht, indem sie in sekundärer Reaktion mit NH_2- bezw. CO-Gruppen zusammentreten. Letztere Reaktionsmöglichkeit scheint bei erhöhter Alkalikonzentration gehemmt zu sein (vgl. Tafel 4).

Es ist auffällig, wie sehr die Alkalilabilität des Schwefels im Cystin gesteigert wird, wenn NH_2- und COOH-Gruppen fortschreitend festgelegt werden. Insbesondere ist es das SS-Glutathion, dessen leichte Spaltbarkeit unter Bildung von 50% SH-Glutathion physiologisch wichtig ist. Diese eigenartige Reaktionsmöglichkeit regt hier zu neuen Fragestellungen an und läßt das SH-SS-System, das ja im Organismus zu einem großen Teil vom Glutathionsystem dargestellt wird, in einem völlig neuen Licht erscheinen[6]).

Zusammenfassend läßt sich also sagen: Die Alkalilabilität des Cystinmoleküls beruht primär ausschließlich auf einer *hydrolytischen Aufspaltung* der SS-Bindung. Der Einbau in größere Komplexe steigert diese Labilität. Die entstehenden SH-Verbindungen sind labiler als die α-SH-

[5]) Diese Möglichkeit soll im hiesigen Institut überprüft werden.
[6]) Vergl. Dissertation *M. Fischer*, Würzburg 1939.

Carbonsäuren und zerfallen unter H_2S-Entwicklung. Der Abbau der Sulfensäure aus den Cystinderivaten und wahrscheinlich auch aus dem Cystin selbst, kann unter S-Abspaltung erfolgen. Diese Reaktion führt vielleicht zur Entstehung von *Oxyaminosäuren,* die sich in *Brenztraubensäure* umwandeln können.

2. Es ist naheliegend, im Anschluß an die diskutierte erhöhte Labilität des Cystinschwefels beim Einbau in eine Peptidkette das Verhalten von *Insulin* von diesem neu gewonnenen Gesichtspunkt aus zu betrachten. *Freudenberg*[7]) stellte jüngst den Disulfidcharakter des Insulins in den Vordergrund der Betrachtungen, da alle Reaktionen, die zu einer Sprengung der SS-Brücke führten (Umsetzung mit KCN, Na_2SO_3, Alkali) eine Inaktivierung des Hormons im Gefolge hatten. Unter diesen Voraussetzungen übertrug er die von *Schöberl* an Disulfidkarbonsäuren gewonnenen Anschauungen auf das Insulin und benutzte gleichfalls die H_2S-Abspaltung als ein Maß für die Geschwindigkeit der SS-Hydrolyse. In einer Diskussionsbemerkung auf der im Juni des Jahres in Frankfurt stattgefundenen Tagung über „Chemie und Physiologie des Eiweißes", schränkte *Freudenberg* die Beteiligung von SS-Gruppen an der Insulininaktivierung wieder ein. Er nimmt jetzt an, daß diese Inaktivierung auch ohne Veränderung des Insulinschwefels, *insbesondere ohne Abspaltung von* H_2S möglich ist. Nun läßt sich aber an Hand der besprochenen Modellsubstanzen beweisen, daß die Hydrolyse der SS-Brücke ohne jede H_2S-Entwicklung möglich sein muß, wenn nur die Versuchsbedingungen geeignet ausgewählt werden. Eine Insulinspaltung mit n-NaOH bei 40° in 15 Minuten ergab folgende Werte:

Cystein: 36,4% H_2S: 14,6% SS: 0%

Es erfolgt also bereits bei Körpertemperatur in 15 Minuten eine vollständige Spaltung, während die H_2S-Menge nur 14,6% beträgt. Die Bilanz läßt sich mit 102,0 angeben. Dabei ist es, wie bei der Beobachtung der Spaltung hervorgeht, durchaus möglich, daß die H_2S-Entwicklung erst bei der zum Hydrolysieren notwendigen Temperatur ausgelöst wird. Infolge Substanzmangel konnte diesen Verhältnissen nicht weiter nachgegangen werden. Trotzdem läßt sich schon aus den angeführten Ergebnissen ersehen, daß die Inaktivierung des Insulins bereits zu einem Zeitpunkt durch hydrolytische Aufspaltung der SS-Bindung bedingt sein kann, zu dem noch keine oder nur sehr geringe H_2S-Entwicklung festzustellen ist. Damit spricht also das Ausbleiben der H_2S-Entwicklung nicht gegen den prosthetischen Charakter der SS-Gruppe im Insulinmolekül.

Ein zweiter löslicher Eiweißkörper, das *Metakeratin* zeigte ein ähnliches Bild. Metakeratin erhält man durch Reduktion von Keratin mit Thioglykolsäure in stark alkalischer Lösung (p_H 12). Das *Keratein* geht in Lösung und nach der Befreiung von Thioglykolsäure und NaOH durch

---

[7]) *K. Freudenberg* und *Th. Wegmann,* H. 233, 159 (1935).

[8]) 3. Tagung für medizinisch-naturwissenschaftliche Zusammenarbeit. Vergl. Angw. Chem. 51, 541 (1938).

Dialyse, werden die SH-Gruppen wieder zu SS-Bindungen mit $K_3Fe(CN)_6$ oxydiert[9]). Das gereinigte Metakeratin hat den gleichen Cystingehalt wie das Ausgangskeratin. Die Spaltung ergibt bei Verwendung von 0,5-n NaOH folgende Werte:

t = 100°, Zeit = 1 St. SH = 7,19% H_2S = 43,5% SS = 0% Bilanz: 101,38.

t = 50°, Zeit = 2 St. SH = 7,74% H_2S = 33,5% SS = 11,3% Bilanz: 93,78%.

Es zeigt sich also, daß auch dieses Cystinpolypeptid ähnlich wie das Insulin, dem gleichen Spaltungsmechanismus gehorcht, wie er für einfache Modelle angegeben wurde.

3. Vor der Übertragung der an den Modellen gewonnenen Gesetzmäßigkeiten auf Schafwolle mit der anschließenden Bearbeitung auch technisch wichtiger Fragen war es *nötig*, dem *Aufbau des Keratinmoleküls* Beachtung zu schenken. Es wurde von Anfang an als sehr unangenehme Lücke empfunden, daß hierüber in chemischer Hinsicht so wenig erschöpfende Kenntnisse vorlagen. Wenn man die hohe technische Bedeutung der Schafwolle kennt, erscheint dies unverständlich. Das Keratin zählt zur großen Klasse der Gerüsteiweißkörper, d. h. es besteht aus Aminosäuren, die im Wesentlichen peptidartig verknüpft sind. Diese Tatsache ist schon lange bekannt. Die quantitative Zusammensetzung der Proteine an Aminosäuren liegt noch sehr im Dunkeln, obwohl das für manche biochemische Fragen, wie neue Ergebnisse der Enzymforschung zeigen, von grundlegender Bedeutung wäre. Für das Keratin der Schafwolle sind die Gründe für diese Situation verschiedener Natur. Einmal ist es der eigenartige Aufbau des Wollkeratins selbst, der eine Analyse sehr erschwert, andererseits machten sich vor allem hier die mangelhaften Methoden der Aufarbeitung von Eiweißhydrolysaten besonders unangenehm bemerkbar. Die klassische Methode *E. Fischers*, die sich auf die Fraktionierung der Ester gründet, brachte bei manchen Eiweißstoffen verhältnismäßig gute Ergebnisse. *Abderhalden*[10]) übertrug diese Methode auf das Keratin, erzielte jedoch nur eine 52%ige Aminosäureausbeute, wobei allerdings Cystin und Tyrosin nicht als Ester sondern direkt ermittelt wurden. Der in der vorliegenden Arbeit unternommene Versuch, diese Methode durch Verwendung von *Methyl-* statt *Äthylestern* zu verbessern, schlug fehl. Auch hier erhielt man keine besseren Ausbeuten an Estern, obwohl eine feinere Aufteilung der Esterfraktionen möglich war[11]). Dabei handelte es sich nicht um Verluste durch Verseifung bei der Behandlung der Esterchlorhydrate mit NaOH, da auch die Verwendung von Natriummethylat keine Steigerung der Ausbeute brachte. Aus diesen Versuchen war zu schließen, daß es sich um prinzipielle Schwierigkeiten

[9]) *L. Michaelis*, Journ. biol. Chem. 106, 605 (1934).

[10]) *E. Abderhalden*, H. 52, 352 (1907).

[11]) Die Esterfraktionen sollen im Institut noch genauer untersucht werden.

bei der Verwendung der Methode handeln mußte. So sind z. B. die Hexonbasen nicht als Ester abzutrennen. Weiterhin zeigte Dakin[12]), daß die Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure nur schwer veresterbar sind und daß die Ester leicht, besonders bei der hohen Destillationstemperatur, in *Diketopiperazine* übergehen. Auch die Verwendung von Methylestern konnte diese Schwierigkeiten nicht beheben. Angestrebt wurde aber eine Aufarbeitung *sämtlicher* Aminosäuren des Keratins in einem einzigen Ansatz. Ein Erfolg war nur von einer Methode zu erhoffen, die von einer Veresterung absah und extreme Bedingungen, wie hohe Temperatur und dergl. vermied. Diesen Forderungen entsprach die von Town[13]) und Brazier[14]) angegebene Methode zur Trennung von Aminosäuren mit Hilfe der Kupfersalze, die merkwürdigerweise überhaupt nicht angewandt wird. Town und Brazier konnten zeigen, daß man die Kupfersalze der Aminosäuren in 3 Klassen einteilen kann:

1. Cu-Salze, unlöslich in Wasser (Asparaginsäure, Leucin, Cystin, Phenylalanin).
2. Cu-Salze, löslich in Wasser aber unlöslich in Methanol (Glutaminsäure, Histidin, Arginin, Lysin, Tyrosin, Alanin, Glykokoll).
3. Cu-Salze, löslich in Wasser aber löslich in Methanol (Prolin, Valin).

Fraktion 3 konnte wieder unterteilt werden in äthanollösliche (Prolin) und äthanolunlösliche (Valin) freie Aminosäuren. Ein großer Vorteil der Methode ist darin zu erblicken, daß sie die ganze Analyse in einem Ansatz auszuführen gestattet. Sie lieferte an Schafwolle ein recht günstiges Ergebnis, das in Tafel 6 zusammengestellt ist.

Wasserunlösliche Fraktion:

	N_2 *in gr.*	*% N_2 d. ges. N_2*	*Aminosäuren in % des Wollgew.*
Asparaginsäure	0,931	2,46	3,68
Leucin	2,140	4,41	8,30
Cystin	0,837	2,12	10,78
Methanolunlösliche Fraktion:			
Glutaminsäure	6,500	16,42	25,30
Histidin	0,548	1,38	0,84
Arginin	8,680	3,19	11,20
Lysin	1,650	4,17	3,58
Alanin + Glykokoll	3,310	8,38	—
Tyrosin	0,372	0,94	2,00
nicht identifiziert	3,092	7,82	8,60
Methanollösliche Fraktion:			
Valin	0,777	1,96	2,69
Prolin	1,190	3,01	4,10
nicht identifiziert	3,990	10,10	—

[12]) *Dakin,* Journ. biol. Chem. 44, 499 (1920).
[13]) *Town,* Biochem. Journ. 22, 4 (1928).
[14]) *B. Brazier,* Biochem. Journ. 24, 1188 (1930).

Sonstige Stickstoffverluste:

Huminstickstoff	0,386	9,76	—
Ammoniakstickstoff	3,780	9,56	—
N_2S in $BaSO_4$	1,231	3,12	—
Gefundener Stickstoff:	39,384		
Gesamtstickstoff:	39,550 = 100%.		

Tafel 6. Zusammensetzung des Wollkeratins.

Es ließen sich also 99,5% des Stickstoffes unter Berücksichtigung aller Adsorptionsmöglichkeiten in den Einzelfraktionen ermitteln. An identifizierten Aminosäuren liegen 72,47% vor. Diese Ausbeute läßt sich bei voller Aufarbeitung noch auf über 85% steigern.

Vergleicht man damit die Ergebnisse von *Abderhalden*[10]), *Marston*[15]), *Calvery*[16]) und *C. I. Block* und *H. B. Vickery*[17])[18])[19]) so zeigt sich, daß die hier angewandte Methode den früheren in jeder Hinsicht überlegen ist. Die Aufarbeitung wird in einem Ansatz ausgeführt. Alle Aminosäuren mit Ausnahme des Cystins können präparativ abgetrennt werden. Die indirekte Ermittlung der Bausteine durch Bestimmung der N-Verteilung nach *van Slyke*, von *Marston*[15]) ausgeführt, ergab fehlerhafte Resultate. Die vorliegende Aufarbeitung stellt die erste *quantitativ durchgeführte Gesamtanalyse* eines einheitlichen Wollekeratins dar. *Marston* täuscht sich wenn er behauptet, alle Schafwollen hätten die gleiche Zusammensetzung. Ernährungsweise und Standort der Schafe sprechen allein schon dagegen (vergl. Abschn. 4). Erst recht falsch ist es, wie es wiederholt versucht wurde, nun etwa aus allen Einzelangaben die höchsten Werte herauszunehmen und auf diese Weise eine Bilanz hochzuzüchten. Hier kann nur eine *Gesamtanalyse* an *einer* Wollprobe zum Ziele führen. Die 100%-Grenze wird wohl wie in anderen Fällen nur schwer erreichbar sein, da ja schon ein nennenswerter Teil der Aminosäuren bei der Hydrolyse selbst vernichtet wird, wie es das Auftreten von Ammoniak beweist. Wenn auch noch nicht alle Feinheiten der Methode geklärt sind und einige Aminosäuren noch nicht in völlig reiner Form anfielen, so verspricht diese Methode doch die *ausbaufähigste* zu sein. Der Übergang zu kleineren Einwaagen würde eine nennenswerte Beschleunigung der gesamten Aufarbeitung sicherstellen. Vergleicht man trotz der Uneinheitlichkeit der verschiedenen Wollen die Bausteinanalysen, insbesondere die Neueren untereinander, so tritt klar hervor, daß das Hauptgewicht auf

---

15) *Marston*, Commonwealth of Australia Counail f. Scientific and industrial Res. Bull. 1928 Nr. 38.

16) *Calvery*, J. biol. Chem. 83, 631 (1929).

17) Journ. biol. Chem. 93, 113 (1931).

18) Vgl. *E. Valko*, Kolloidchemische Grundlagen der Textilveredlung, Berlin 1937.

19) *K. Grafe*, Kap. Wolle im Handbuch der Gerbereichemie und Lederfabrikation, Wien 1938.

den *basischen* und *sauren Aminosäuren* und dem Cystin liegt. Schon daraus ergibt sich, daß diesen Komponenten *besondere Funktionen* im Aufbau des Keratins zukommen müssen. Für das Cystin läßt sich sagen, daß es mit seinen SS-Bindungen Querbrücken zwischen den langen Peptidketten abgibt. Zerstört man jedoch diese Brückenbindungen durch Wasser, so tritt damit noch keine völlige Lösung ein, selbst wenn alle SS-Bindungen vernichtet werden (Näheres Abschn. 5). Es sind also zur Verfestigung der Keratinfasern untereinander noch andere Querverbindungen vorhanden, die die charakteristischen Löslichkeitseigenschaften des Keratins mitbedingen. Der hohe Gehalt des Keratins an sauren und basischen Gruppen macht salzartige Bindungen sehr wahrscheinlich. Bestätigt wurden dann diese Anschauungen durch ausführliche Untersuchungen von Astbury[20]) und Speakman[21]), die mit Röntgeninterferenzmessungen Veränderungen am Keratinmolekül studierten. Speakman konnte dann auch höhere Glutamin- und Asparaginsäurewerte finden, doch beschränken sich die Versuche auf eine Wollprobe ohne Durchführung einer Gesamtanalyse, besonders ohne Bestimmung der basischen Komponenten. Eine Übernahme der Marston'schen Werte ist nicht zu rechtfertigen.

4. Zeigte der vorhergehende Abschnitt einen Überblick über das Gesamtbild der Aminosäuren, die zu den Bausteinen des Wollekeratins zählen, so soll in diesem Abschnitt auf das für das Keratin so charakteristische Cystin näher eingegangen werden. Es ist auffällig, daß uns hier ein Protein entgegentritt, das neben dem Insulin wohl über den *größten Schwefelgehalt* verfügt. Es erhob sich mit Recht die Frage in welcher Bindungsform der Schwefel vorliegt. Es hat nicht an Versuchen gefehlt, auch *Methionin* in der Wolle nachzuweisen. Wo es gelang[22]), handelte es sich um Bruchteile von Procenten, die meistens schon innerhalb der Fehlergrenze der von *Baernstein*[23]) angegebenen Methode der Methioninbestimmung lagen. Diese Tatsache ist auch verständlich, denn wie Abschnitt 3 zeigte, kommt ja gerade der *SS-Brücke* mit die Aufgabe einer Faserverfestigung zu. Da nun nicht jede Wolle gleiche mechanische Eigenschaften zeigt, war auch vom chemischen Aufbau, insbesondere vom Schwefelgehalt zu erwarten, daß Schwankungen vorhanden sein mußten. Es wurden in diesem Zusammenhang Wollen von verschiedener *Herkunft*, von verschiedenen *Schafrassen* und von verschiedenen *Faserquerschnitten* auf ihren Gehalt an *Schwefel*, *Cystin* und *Stickstoff* untersucht. Selbst eine Unterteilung der gleichen Wollen in *Bauch-* und *Rückenwollen* wurde vorgenommen.

Voraussetzungen für derartige Untersuchungen waren exakte und rasch durchführbare analytische Methoden zur Bestimmung von Schwefel und Cystin. Die Schwefelbestimmung war bereits unter Verwendung des

[20]) *W. T. Astbury,* Melliands Textilber. 16, 1 (1935).
[21]) *I. B. Speakman* und *Townend,* Nat. 139, 411 (1937).
[22]) *J. Barrit,* Biochem. Journ. 28, 1 (1934).
[23]) *Baernstein,* J. biol. Chem. 97, 663 (1932).

von *Grote* und *Krekeler* angegebenen Quarzrohres, von *Schöberl*[24]) auf Halbmikroverhältnisse umgearbeitet worden. Die Brauchbarkeit dieser Methode bestätigten jüngst neben anderen Autoren auch das Analytische Laboratorium der I. G. Farbenindustrie A.G. Werk Ludwigshafen[25]). Schwefelbestimmungen in den schwer verbrennbaren Keratinen waren damit ohne nennenswerte Schwierigkeiten möglich.

Aus Gründen die später noch dargelegt werden, wurde zur Bestimmung des Cystins die von *O. Folin* und *A. O. Marenzi*[26]) kolorimetrisch ausgewertete Blaufärbung von 9 (18) Wolframsäure-Phosphorsäure (als WPhS abgekürzt) gewählt, die auf einer Reduktion des Heteropolysäurenkomplexes beruht. Die Grundlagen des Verfahrens gaben *A. Schöberl* und *E. Ludwig*[27]) bereits an. Schwankungen in den Ergebnissen gaben Veranlassung, mit Hilfe einfachster SH- und SS-Systeme den Fehlerquellen nachzugehen. Cystein kann quantitativ von 9 (18) Wolframsäure-Phosphorsäure (SWO_3) im Sinne der Gleichung:

$$2RSH + SWO_3 \rightleftharpoons RS{-}SR + H_2O + SWO_2$$

oxydiert werden. Die Bestimmung von Cystin auf gleicher Grundlage ist deshalb möglich, weil eine glatte Aufspaltung der SS-Bindung mit Natriumsulfit nach folgender Gleichung ebenfalls zur SH-Verbindung führt:

$$RS{-}SR + Na_2SO_3 \rightleftharpoons RSNa + RS{-}SO_3Na$$

Voraussetzung ist, daß sich beide Vorgänge mit hinreichender Geschwindigkeit abspielen. Unter gewissen Bedingungen ist dies der Fall. Die beiden Gleichungen greifen als Folgereaktionen ineinander. Es bedingt dies eine Verdoppelung der mit Cystein allein erzielbaren Farbstärke durch Sulfitzusatz, denn das aus dem Cystein durch Oxydation mit WPhS entstehende Cystin wird immer wieder von Sulfit disproportioniert. Die volle Farbstärke erreicht man erst dann, wenn das gesamte Cystein bezw. Cystin in das Derivat der schwefligen Säure $RS{-}SO_3H$ übergeführt ist. Diese Verdoppelung ist der erste wesentliche Gesichtspunkt, der bei der colorimetrischen Bestimmung des SH-SS-Systems beachtet werden muß. Ebenso wichtig erscheint andererseits die Tatsache, daß gleichmolare Konzentrationen an Cystein und Cystin bei Anwesenheit von Sulfit die gleiche Farbintensität liefern. SH-Verbindung und Disulfid besitzen also der WPhS gegenüber das gleiche Reduktionsäquivalent. Beide oben erwähnten Reaktionen sind Zeitreaktionen. Jedoch dürfte in erster Linie nach den Ergebnissen bei anderen Disulfiden die Einwirkung von Sulfit auf Cystin geschwindigkeitsbestimmend sein. Hierauf ist bei der experimentellen Durchführung zu achten. Für die Oxydation der Heteropolysäure und die Öffnung der SS-Bindung muß genügend Zeit zur Verfügung stehen. In jedem Falle hat man die Einstellung des Farbmaximums abzuwarten.

---

[24]) *A. Schöberl*, Z. Angew. Chem. 50, 334 (1937).
[25]) *Wurzschmitt* und *Zimmermann*, Zt. analyt. Chem. 114, 321 (1938).
[26]) Journ. Biol. Chem. 83, 103 (1929).
[27]) B. 70, 1422 (1937).

Aufbauend auf diesen Grundtatsachen wurden die Messungen an Cystein und Cystin mittels des *Pulfrich-Photometers* durchgeführt. Bei photometrischen Verfahren kam die Herstellung einer Vergleichslösung in Fortfall, wodurch das Verfahren bedeutend vereinfacht wird. Dafür hat aber die Photometrie als Absolutmethode die genaue Kenntnis aller die Farbstärke beeinflussenden Faktoren zur Voraussetzung. Dies war im vorliegenden Fall besonders deshalb nötig, weil die Anwesenheit von Sulfit einige Komplikationen verursacht. Wie aus der von *Schöberl* und *Ludwig* ermittelten Absorptionskurve hervorgeht, war für die Vermessung der blauen Farbe das Rotfilter mit dem Filterschwerpunkt bei 729 mμ am geeignetsten. Mit der Aufstellung der Eichkurven schälten sich dann die für die Bestimmung wesentlichen Erscheinungen heraus. Zunächst war für die Farbverbindung aus WPhS die Gültigkeit des *Beer'schen* Gesetzes zu beweisen. Es sind zu diesem Zweck verschiedene Thioglykolsäure- und Cysteinkonzentrationen vermessen worden. Thioglykolsäure wurde deshalb mit vermessen, weil ihre Lösung gegen Sauerstoff weniger empfindlich ist und die jodometrische Einstellung ihrer Lösung gut möglich war. Tafel 15 gibt die Proportionalität zwischen Konzentration und Farbintensität wieder. Geringe Abweichungen bei den hohen Konzentrationen sind im wesentlichen auf Ableseschwierigkeiten wegen der hohen Extinktion zurückzuführen. Die Eichkurve für Cystein fällt im gleichen Konzentrationsbereich von $1 \cdot 10^{-4}$ bis $6 \cdot 10^{-4}$ molar mit der Thioglykolsäurekurve fast zusammen. Die Abweichungen lassen sich in erster Linie darauf zurückführen, daß die Konzentrationen der benutzten Cystein-Lösungen nicht durch jodometrische Titration eingestellt waren. Ganz allgemein wird man überdies bei kolorimetrischen Bestimmungen von SH-Verbindungen, besonders in sehr verdünnten Lösungen, eine wenn auch geringe Oxydation durch Luftsauerstoff nie ganz vermeiden können, wenn man dabei vor allem die leichte und rasche Durchführbarkeit der Bestimmung, was ja für praktische Zwecke allein wichtig ist, im Auge hat. Die für die Thioglykolsäure ermittelten Extinktionskoeffizienten (= Ek) liegen, wenn man sie graphisch gegen die Konzentration aufträgt, auf einer Geraden, die durch den Nullpunkt geht. Damit ist die Gültigkeit des *Beer'schen* Gesetzes für die vorliegende Farbreaktion erwiesen. Daß Thioglykolsäure und Cystein der WPhS gegenüber das gleiche Reduktionsäquivalent besitzen, war zu erwarten. Die Methode ist von hoher Empfindlichkeit und als Mikrobestimmung für Cystein und andere SH-Verbindungen ohne weiteres geeignet. In vorliegenden Ansätzen waren 151 γ Cystein und 115 γ Thioglykolsäure in 25 ccm noch glatt bestimmbar.

Bei der Ermittlung der Eichkurve für Cystin ergaben sich mitunter, besonders wenn die Messungen zeitlich weit auseinander lagen, beträchtliche Schwankungen (vgl. Tafel 19). Schließlich erklärte sich der Mißstand durch den starken Einfluß der *Temperatur*. Wie aus Abb. 2 hervorgeht, *erniedrigt* Temperaturerhöhung die Extinktionskoeffizienten sehr

stark und man kann ohne weiteres erkennen, daß auch Schwankungen in der Zimmertemperatur bereits Unterschiede in den Extinktionen ergeben, die außerhalb der Fehlergrenze der Methode liegen. Hieraus ergab sich die Notwendigkeit, die Bestimmungen bei konstanter Temperatur durchzuführen, für die aus verschiedenen Gründen 20° gewählt wurde. Jetzt wurden stets reproduzierbare Werte erhalten. Die Eichwerte für Cystin lieferten bis herab zu $4 \cdot 10^{-5}$ mol. eine Schar von Extinktionskoeffizien-

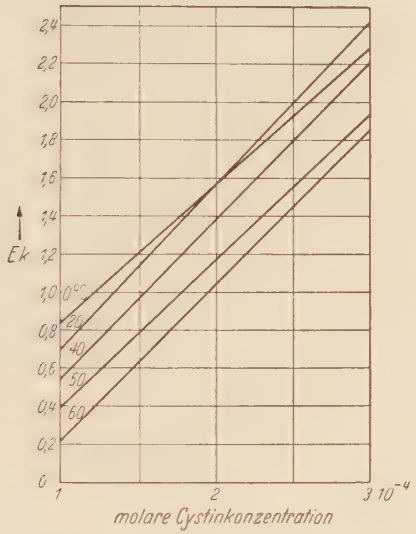


Abb. 2

ten, die gut auf einer Geraden lagen. Nur bei niedrigen Konzentrationen erfolgte kein geradliniger Verlauf mehr. Von Anfang an fiel besonders auf, daß die Cystineichkurve fast genau parallel zur Thioglykolsäurekurve verlief. Dies wies darauf hin, daß es sich nicht um eine generelle Ungültigkeit des *Beer*'schen Gesetzes handeln konnte. Auch eine Annahme eines nicht vollständigen Umsatzes des Disulfides mit Sulfit oder WPhS kam deshalb nicht in Frage. Die Eichkurve für Cystein (mit Sulfit vermessen) liegt etwas über der für Cystin. Die eingangs erwähnte Forderung der Theorie ist also nicht ganz genau erfüllt.

Bei der Aufstellung der Eichkurven hatte man, wie das bei photometrischen Bestimmungen üblich ist, die entsprechenden Blindwerte berücksichtigt (vgl. Tafel 17 und 18). Diese waren hier im Vergleich zu den Blindwerten bei der Bestimmung ohne Sulfit besonders hoch, weil das in hoher Konzentration anwesende Natriumsulfit die Heteropolysäure selbst reduzieren kann. Dieser Sulfitblindwert ($= bEk_{II}$) ist von den

gefundenen Extinktionskoeffizienten jeweils abgezogen worden. Alle Versuche deuten nun darauf hin, daß es *nicht* zulässig ist, den Sulfitblindwert in Abzug zu bringen. Beim Arbeiten mit Eichkurven hat diese Forderung allerdings keine Bedeutung, da es sich ja nur um eine parallele Verschiebung der Kurve handelt. Tafel 17 und 18 enthalten auch die durch Umrechnung erhaltenen neuen Werte. Hierbei wurden nur die einfachen Blindwerte (bedingt durch Küvetten, Lösungsmittel, Substrat und WPhS $=$ bEk_1) abgezogen. Man sieht, wie sich dadurch die beiden Eichkurven der idealen Thioglykolsäurekurve angleichen.

Aus dieser Sachlage ergibt sich zwangsläufig die Folgerung, daß Natriumsulfit die WPhS nicht zu reduzieren vermag. Vielleicht erfolgt in dem System eine *Hemmung der Oxydation von Sulfit,* etwa so, wie Herr Dr. Schöberl mir unveröffentlichte Versuche seinerseits schilderte. Danach läßt sich die durch Kupfer katalysierte Oxydation von Natriumsulfit durch Luftsauerstoff mit SH-Verbindungen hemmen. Wie man ferner am Verlauf der Eichkurve für Cystin sieht, genügt unterhalb einer Konzentration von $4 \cdot 10^{-5}$ mol. diese Hemmung nicht mehr, um die Sulfitwirkung auf das Reagens ganz auszuschalten. In diesem Konzentrationsbereich trägt zweifellos das Sulfit selbst in, wenn auch bescheidenem Maße, zur Farbintensität bei. So sind die etwas zu hohen Extinktionskoeffizienten in diesem Bereich zu deuten. Auch einige orientierende Versuche mit wechselnder Sulfitkonzentration sprechen für die hier dargelegte Ansicht. Bei Abwesenheit von Substrat nimmt im Blindversuch die Farbintensität mit der Zunahme der Sulfitkonzentration zu. Bei steigender Sulfitmenge müssen daher die Extinktionen der Farbwerte stark abnehmen, wenn man gegen den Sulfitblindwert vergleicht. Bei Nichtberücksichtigung der Sulfitreduktion dürften andererseits die Extinktionskoeffizienten keinen derartigen Gang zeigen. Das ist nun nach Tafel 20 der Fall.

Für die praktische Durchführung der Cystinbestimmung mit WPhS ist zu empfehlen, mit einer Eichkurve zu arbeiten und die Sulfitreduktion nicht zu berücksichtigen. Im allgemeinen sind dann die gefundenen Farbintensitäten etwas niedrig. Abgesehen von den üblichen Fehlermöglichkeiten mag die Ursache vielleicht in Gleichgewichten bei den der Bestimmung zugrunde liegenden Reaktionen zu suchen sein. Die Bestimmung von Cystein mit Sulfit liefert unter diesen Umständen Farbwerte, die nur wenig niedriger sind als die entsprechenden Werte bei der Thioglykolsäure. Im allgemeinen können aber bei der merkwürdigen Sprengung der SS-Bindung im Cystin die experimentellen Ergebnisse durchaus befriedigen. Überdies handelt es sich auch hier um eine sehr empfindliche Bestimmungsmethode. $1 \cdot 10^{-5}$ mol. Cystinlösungen lassen sich noch glatt vermessen. Es wurden 60 γ Cystin in 25 ccm noch mit hinreichender Genauigkeit bestimmt und dabei in Küvetten gearbeitet. In Mikrorohren läßt sich ohne weiteres noch weniger Cystin ermitteln.

Besonders übersichtlich kommt der Einfluß der Temperatur bei der Cystinbestimmung mit WPhS zum Ausdruck, wenn man wie in Abb. 3 die Änderung des Extinktionskoeffizienten mit der Temperatur bei ver-

schiedenen Konzentrationen graphisch aufträgt. Je nachdem man dabei den Sulfitblindwert oder den einfachen Blindwert abzieht, erhält man eine Schar charakteristisch verlaufender Kurven. In beiden tritt, was besonders auffällt, bei den zwei höchsten Konzentrationen ein ausgesprochenes Farbmaximum bei 20—25° auf. Der Einfluß der Temperatur in diesem Ge-

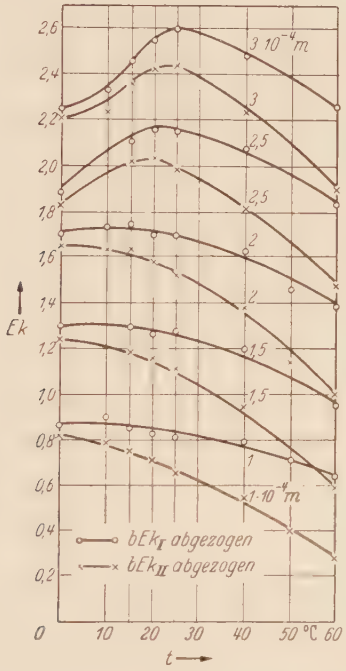


Abb. 3

biet ist außerordentlich stark. Wichtig aber ist der Befund, daß vor allem die bei Berücksichtigung der Sulfitreduktion erhaltenen Kurven (x—x) eine so ausgeprägte Temperaturabhängigkeit zeigen. Der Grund hierfür dürfte fast ausschließlich in der Temperaturabhängigkeit der Sulfitreduktion selbst liegen. Mit steigender Temperatur liefert nämlich die Einwirkung von Sulfit auf WPhS stark zunehmende Farbintensitäten (Tafel 14). So ist es klar, daß bei hoher Temperatur wegen des Abzuges hoher Sulfitblindwerte (bEk_{II}) die Extinktionen klein sein müssen. Jedoch zeigt auch die eigentliche Farbreaktion, wie ebenfalls aus Abb. 2 hervorgeht, eine gewisse Temperaturabhängigkeit, die bei hohen Konzentrationen sogar recht ansehnlich ist (o——o). Bei etwa 20° fällt allerdings bei Kon-

zentrationen von 1 bis 2.10^{-4} mol. eine geringe Temperaturänderung nicht stark ins Gewicht. Damit ist also im Wesentlichen der Einfluß der Temperatur auf die Beeinflussung der Sulfitreduktion der WPhS zurückgeführt. Diese selbst tritt aber nach den obigen Erörterungen bei der vorliegenden Bestimmung nicht in Erscheinung. Betont sei, daß eine eingehende Untersuchung des gesamten Fragenkomplexes nicht beabsichtigt war, da es hier nur auf die Festlegung der für die Bestimmung maßgebenden Faktoren ankam. Es ist zu vermuten, daß die mit der Temperatur zunehmende Verringerung der Farbintensität auf eine geringe Dissotiation des Farbkomplexes aus der Heteropolysäure zurückzuführen ist. Wichtig ist jedenfalls, daß die Sulfiteinwirkung auf Cystin sich auch bei tiefer Temperatur glatt und hinreichend rasch vollzieht. Eine kinetische Untersuchung der Geschwindigkeit der Oxydation von Cystin durch WPhS ist nicht vorgenommen worden.

Hiermit war also eine exakte Methode zur Bestimmung von Cystein und Cystin gewonnen. Da die Methode auf einer Reduktion der WPhS durch SH-Verbindungen beruht, war mit Recht zu erwarten, daß auch höher molekulare SH-Verbindungen (Polypeptide) zu dieser Reduktion befähigt seien. *Schöberl* und *Krume*[1]) untersuchten SH- und SS-Glutathion und fanden, daß das SH-Glutathion bei p_H 5,2 zu dieser Reduktion *nicht* befähigt war, dagegen bei p_H 7,3 gleiche Farbstärke entwickelte. Aus diesem Grunde wurden alle Messungen von SH-Verbindungen, insbesondere bei den Spaltversuchen, in *Bikarbonat*lösungen ausgeführt. Anders dagegen verhielt sich das SS-Glutathion. Die Einwirkung von Sulfit schuf hier eine SH-Verbindung, die eine dem Cystein bei p_H 5,2 gleiche Farbstärke lieferte. Es mußte also auch ein *anhydrolysiertes* Protein, sofern es mit WPhS keine Fällung mehr gab, eine dem vorhandenen Cystin äquivalente Farbtiefe ergeben. Um hierüber Klarheit zu schaffen, wurden eine Reihe von Wollproben mit 6-n H_2SO_4 gekocht und in bekannten Zeitabständen das Fortschreiten der Hydrolyse an der Zunahme der freien NH_2-Gruppen bestimmt (vgl. Tafel 22 und 23). Es zeigte sich, daß nach 8 Stunden die Hydrolyse praktisch beendet war. Bei den Cystinbestimmungen in den Hydrolysaten ergaben sich zunächst Schwierigkeiten, die in der Beschaffenheit des Ausgangsmaterials ihre Ursache hatten. Besonders war es die Uneinheitlichkeit des Materials, was zu Schwankungen im Cystingehalt führte. Jedoch konnte diese Fehlermöglichkeit durch einige Kniffe behoben werden (vgl. experimentellen Teil). Die zu den gleichen Zeiten wie die NH_2-Gruppen ermittelten Cystinwerte sind zusammen mit der Menge der freien NH_2-Gruppen in Abb. 4 aufgetragen. Vgl. auch Tafel 24 bis 28.

Die nach *einer* Stunde ausgeführten Cystinbestimmungen zeigen bereits die *gleiche Höhe*, wie die nach 8-stündiger Hydrolyse gefundenen Werte. Zu diesem Zeitpunkt sind aber bei weitem nicht alle Cystinmoleküle in Freiheit gesetzt. Es sprechen also wie zu erwarten war, die cystinhaltigen Bruchstücke vollwertig auf WPhS an. Die über längere Zeit ausgedehnten Versuche führen eher noch zu einer Erniedrigung des Cy-

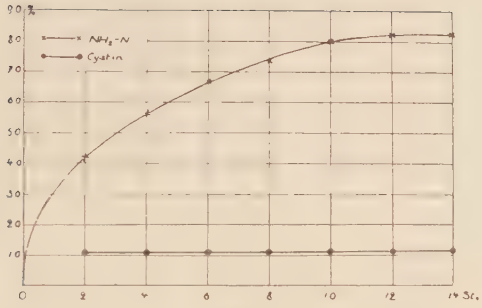


Abb. 4.

stinwertes (vgl. Tafel 27). Ähnliche Versuche wurden mit Edestin und Albumin angestellt, doch tragen diese vorerst nur orientierenden Charakter (Tafel 29 und 30). Um ein Bild über den Umfang der bei der Hydrolyse eintretenden Zerstörung des Cystins zu gewinnen (H_2S konnte nachgewiesen werden), wurde eine Cystinlösung von bekanntem Gehalt 8 Stunden mit 6-n H_2SO_4 gekocht. Von 24,02 mg Cystin fand man nur mehr 23,2 mg. Es ist also ratsam, die Hydrolyse nach 2—4 Stunden abzubrechen und nicht, wie allgemein angegeben wird, 24 und mehr Stunden zu hydrolysieren. Die kurze Hydrolysendauer und die allgemeine Anwendbarkeit sichert dieser Methode die Überlegenheit vor der von *Sullivan* angegebenen Bestimmung. Man kann einwenden, daß die Methode von *Sullivan* spezifisch für Cystin sei und WPhS auch noch auf andere Reduktionsmittel anspreche. Dieser Einwand wurde bei der Benützung der WPhS für die Hydrolysate und Spaltansätze berücksichtigt. Ist das Hydrolysat, wie in den meisten Fällen, frei von SH-Verbindungen, so werden andere Reduktionsmittel durch den einfachen Blindwert ausgeschaltet. Aminosäuren beeinflussen den Blindwert und die Cystinbestimmung nicht. Als nämlich reinstes Gelatinehydrolysat bei der Cystinbestimmung zugesetzt wurde, erhielt man folgende Werte: Einwaage: 24,02 mg Cystin, gefunden: 24,07 mg. Man kann also auch in Aminosäuregemischen Cystin mit WPhS bestimmen. Die gefundenen Werte sind durchaus befriedigend.

Weitaus entscheidender ist die Frage *anderer reduzierender Substanzen,* wenn es sich um die Bestimmung von SH-Gruppen handelt. Im Falle des Cystins und bei Cystin-di- und polypeptiden mißt man bei p_H 5,2. In saurer Lösung sprechen aber weitaus weniger Substanzen auf WPhS an. Cystein-di- und polypeptide werden aus den oben angegebenen Gründen bei p_H 7,3 gemessen. Hier ist die Anzahl reduzierender Substanzen (Ketoverbindungen) schon größer. In diesem Falle schaltet man die reduzierende Wirkung der SH-Gruppen aus, indem man sie als *Merkaptide* festlegt und dann den Blindwert ermittelt. Handelt es sich um die Be-

stimmung von SH- und SS-Gruppen nebeneinander und bei Gegenwart anderer reduzierender Substanzen (Spaltversuche), so sind eine Reihe von Farbansätzen nötig. Diese und die Berechnung findet man im experimentellen Teil angegeben. Der Farbwert der SH-Verbindung bei Gegenwart von Sulfit wird auf Grund des getrennt ermittelten wahren SH-Wertes aus der Kurve für Cystein + Sulfit abgelesen.

Unter Zugrundelegung dieser Methode der Cystinbestimmung und der eingangs erwähnten Schwefelbestimmung konnten brauchbare Werte über die Schwefelbilanz im Keratin erwartet werden. In dieser Arbeit fanden die folgenden Wollesorten Verwendung:

Herkunft	*Bauch oder Rücken*	*Qualität*	*Faserquerschnitt in μ*	*laufende Bezeichnung*
Neuseeland	Bäuche	C I	25,5	5 a
Neuseeland	Rücken	C I	25,5	5 b
Bs. Dires	Bäuche	C II	27,3	6 a
Kap	Bäuche	A/AA	17,5	8 a
Kap	Bäuche	A/AA	17,5	8 b
Buenos Aires	Rücken	E	34—36	10 b
Buenos Aires	Rücken	E	34—36	11 b
Deutschland	gemischt	—	—	12

Tafel 7. Zusammenstellung der benutzten Wollen.

In diesen Proben wurden nun S- und Cystinbestimmungen ausgeführt. Der N-Gehalt wurde nach Mikro-*Kjeldahl* ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tafel 8 zusammengefaßt.

Wolle	*5 a*	*5 b*	*6 a*	*8 a*	*8 b*	*10 b*	*11 b*	*12*
N-Geh. %	14,8	17,5	15,3	17,15	15,40	16,30	16,59	15,35
Cystin %	7,75	11,1	10,2	11,8	11,96	11,48	10,87	11,2
S-Geh. %	2,96	3,29	3,99	3,61	3,89	3,59	2,90	3,52
Cyst.-S %	2,06	2,95	2,71	3,14	3,18	3,05	2,89	2,98
Schädig. %	30,5	10,3	32,0	13,0	18,2	15,0	0,4	15,3

Tafel 8. Zusammenstellung des Gehaltes verschiedener Wollen an N, S, Cystin.

Die unter Schädigung angegebenen Werte zeigen, wie viele von 100 SS-Bindungen schon gelöst sind, unter der Voraussetzung, daß der gefundene S-Gehalt den ursprünglichen Cystingehalt angibt. Auf diese Verhältnisse wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen werden. Der Vergleich der Schwefelwerte der verschiedenen Wollen und auch der Bauch- und Rückenwollen zeigt, daß nicht jede Wolle den *gleichen* Schwefelwert aufweist. Deutlicher noch treten diese Verhältnisse an den Cystinwerten zutage. Hier treten Schwankungen bis zu 4,2% Cystin auf, was

weit außerhalb jeder Fehlergrenze liegt. Auch im Stickstoffgehalt sind nennenswerte Schwankungen zu verzeichnen. *Marston*[15]) fordert unverständlicherweise für alle Wollsorten gleichen Stickstoff-, Schwefel- und Cystingehalt. Es muß ein besonderer Zufall sein, eine größere Anzahl völlig gleichartiger Wollen zu finden. Wenn sich in der vorliegenden Untersuchung schon nennenswerte Unterschiede zwischen Bauch- und Rückenwollen ergeben, so ist klar, daß erst recht Unterschiede zwischen verschiedenen Tieren auftreten können. Ernährung, Lebensweise und Umwelt beeinflussen das Haarwachstum in entscheidender Weise. Ferner erkennt man, daß nicht aller Schwefel als Cystinschwefel vorliegt. Zur Erklärung dieser Tatsache sei auf Abschn. 6 verwiesen.

5. Die technische Wollwäsche und Wollfärbung ließen die Frage nach der Schädigung dieses Keratins immer mehr in den Vordergrund treten. Es hat dies vor allem auch bei der Rohstofflage Deutschlands im Interesse einer schonenden Verarbeitung dieses wichtigen Rohstoffes hohe Bedeutung, da die Wolle in erheblichem Umfange aus dem Auslande eingeführt werden muß.

Der Cystinrest stellt die schwächste Stelle im Keratinmolekül dar. Abschn. 1 zeigte, daß die Labilität des Cystins zunimmt, wenn COOH- und NH_2-Gruppen peptidartig festgelegt werden. Es ist also keineswegs verwunderlich, wenn das Keratin als ein ausgesprochenes Cystinpeptid erhöhte Empfindlichkeit gegen Alkali zeigt. Dabei setzt man voraus, daß das Cystin im Wollekeratin nach dem gleichen Chemismus angegriffen wird, wie er für einfache Cystinpeptide anfänglich gefordert wurde. *Harris*[28]) läßt für die Spaltung der SS-Brücke die Theorie von *Bergmann* und von *Schöberl* gelten. *Harris* beschreibt auch den Nachweis von SH-Gruppen auf der Faser mit Nitroprussidnatrium. Dieser Nachweis erscheint jedoch nicht exakt genug und ließ auch vor allem keine quantitative Aussagen zu. Dieser Nachweis konnte deshalb auch nicht zwischen der Forderung *Bergmanns* und der *Schöberls* entscheiden. Ferner bestimmte Harris die Menge abgespaltenen Schwefelwasserstoffes nicht, sondern beschränkte sich auf die Ermittlung des Schwefelgehaltes der behandelten Wolle. Der Schwefelgehalt dieser alkalibehandelten Wollen ist unbehandelten Wollen gegenüber nur wenig gesenkt, während der Cystingehalt anfänglich *stark fällt* um dann bei längerer Einwirkung nur mehr *wenig* abzunehmen. Allein die letzte Tatsache scheint dazu geeignet, ein vollständig verzerrtes Bild der Angreifbarkeit des Wollekeratins zu entwickeln. Warum der Angriff auf die zweite Hälfte des Cystins größenordnungsmäßig langsamer erfolgen soll, ist nicht einzusehen. Nimmt man jedoch an, daß es sich hier um *Cystein* handelt, so ist eine Erklärung nicht schwer. Daß natürlich dieses Cystein bei der Hydrolyse, die der Bestimmung vorausgeht *oxydiert* wird, ist wohl selbstverständlich. Die *quantitative Bestimmung des Cysteins* mußte möglich sein, wenn man Alkali-

[28]) Part of Journal of Research of the National Bureau of Standarts, 15, 63 (1935); 16, 475 (1936).

spaltung und Hydrolyse unmittelbar hintereinanderschaltete und dabei jede Spur Sauerstoff peinlich vermied. Gleichzeitig konnte man noch NH_3, H_2S und *unverändertes Disulfid* (vgl. Abschn. 1) ermitteln. Tafel 9 zeigt die Ergebnisse.

Temperatur	*50*	*50*	*50*	*50*	*30*	*120 Bad*)*
Spaltzeit	0,5	2	5	10	2	24
NH_3 in % d. Th.	Sp.	17,8	30,0	82,0	—	
H_2S in % d. Th.	13,8	18,3	19,35	18,6	10,7	6,45
SH in % d. Th.	6,94	8,1	8,12	12,2	8,35	2,37
SS in % d. Th.	26,5	22,2	25,0	12,75	28,2	71,6
Bilanz	67,98	75,0	79,94	74,35	66,3	89,24

Tafel 9. Spaltung von Wollekeratin mit Alkali und Wasser (Wolle 11b).

In Anbetracht der heterogenen Reaktion an der Faseroberfläche lassen sich selbstverständlich die für homogene Lösungen entwickelten Anschauungen nicht streng anwenden. Die schwierige Spaltbarkeit des übrigbleibenden Restdisulfides dürfte in der Hauptsache auf eine oberflächliche *Gelatinisierung* der Faser zurückzuführen sein. Wenn die Bilanzwerte 100 nicht erreichen, so können wohl *sekundäre Reaktionen* der SH-Gruppen mit NH_2- und CO-Gruppen dafür verantwortlich gemacht werden. In allenFällen zeigen die Versuche, daß *eindeutig* Sulfhydrylgruppen auftreten und daß damit die Annahme einer primären hydrolytischen Aufspaltung der SS-Brücke auch für das Wollekeratin zulässig ist.

Aus den Wollfärbereien ist bekannt, daß sich am Grunde der Farbbäder eine gelatinöse Masse, die *Wollgelatine* ansammelt, die aus der Wolle bei höherer Temperatur herausgelöst wird. Es muß also neben dem Angriff auf die SS-Brücke auch noch die Bildung niedriger molekularer Bruchstücke (*Peptone*) einherlaufen. Um hierüber einige Klarheit zu gewinnen, wurde das Studium der *Wassereinwirkung auf Wolle* begonnen. Auch diese *praktisch* und *technisch wichtige Frage* fand bisher merkwürdigerweise keine erschöpfende Bearbeitung. Hierbei war vor allem auf exakte *Versuchsbedingungen* besonderer Wert zu legen. Die erste Frage war die, ob auch hierbei SH-Gruppen auftreten. Tafel 9 zeigt einen Ansatz mit Wasser bei 120° Badtemperatur. Die Spaltung verläuft langsamer, doch lassen sich auch hier H_2S und SH ohne jeden Zweifel nachweisen. Zur Erzielung weitgehender Spaltung mußte man die Versuche über *längere Zeit* (bis 21 Tage) ausdehnen, wobei auch wieder verschiedene Wollqualitäten verwandt wurden. Vgl. dazu Tafel 31 bis 34. Abb. 5 zeigt den Verlauf der NH_3- und H_2S-Abspaltung, die streng parallel gehen. Daraus ließ sich jedoch nur schließen, daß mit dem Auftreten von NH_3 Peptidbindungen zerstört werden müssen. Da nun die

*) Spaltung mit Wasser.

NH_3-Entwicklung von der H_2S-Bildung abhängt, so ist auch für die Schaffung kleinerer Bruchstücke die Spaltung der SS-Brücke verantwortlich zu machen. Es war also um so größeres Gewicht auf die verbleibende Wolle und den in Wasser gelösten Anteil zu legen. Beide wurden auf ihren Gehalt an Stickstoff, Schwefel und Cystin untersucht. Tafel 10 enthält alle wichtigen Daten.

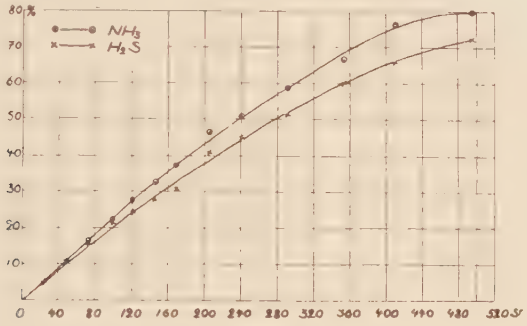


Abb. 5.

Vergleicht man den Schwefelgehalt der wasserbehandelten Wollen mit dem Cystingehalt, so zeigt sich, daß der Schwefelgehalt bei weitem nicht so schnell abnahm wie der Cystinwert. Eine Gegenüberstellung des aus dem Cystinwert berechneten Schwefels läßt offenkundig an das Vorhandensein anderer Bindungsarten des Schwefels denken. Die in Lösung gegangenen Anteile zeigen das gleiche Bild noch drastischer. Auffällig niedrig ist der Gehalt des wasserlöslichen Anteiles an Cystin im Vergleich zu den Cystinwerten der wasserbehandelten Wollen. Nach dem im Abschnitt I Gesagten, läßt die abgespaltene H_2S-Menge keinen Schluß über den Umfang der Spaltung zu. Um also die *Geschwindigkeit der Spaltung* zu bestimmen, mußte der Versuch nach bestimmten Zeiten ganz unterbrochen und die wasserlöslichen und wasserunlöslichen Anteile auf ihre Zusammensetzung hin untersucht werden. In Abb. 6 sind die Cystinwerte einer wasserbehandelten Wolle in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Man sieht deutlich den scharfen Abfall am ersten Versuchstag, während über die weiteren Tage die Werte nahezu konstant bleiben und etwa die Hälfte des ursprünglichen Cystinwertes darstellen. Die Deutung ist einfach. Die SS-Brücke wird schon ganz zu Beginn hydrolytisch gespalten. Dabei entstehen *SH-Protein* und *SOH-Protein*. Das SH-Protein ist stabiler als das SS-Protein und wird von Wasser nur langsam angegriffen, wobei dann H_2S entwickelt wird. Mit Schwefelwasserstoff tritt die gleiche Menge NH_3 auf, was auf die Spaltung von Peptidbindungen hindeutet. Das auf diese Weise niedriger molekular werdende Eiweiß geht in Lösung. Dabei zeigt sich, daß der Cystin- und Schwefel-

Wolle	5 a	5 b	8 a	11 b	10 b	10 b	10 b	10 b
Versuchsd. St.	496	337	337	314	24	48	72	96
Wasserunlöslicher Anteil:								
abgesp. H_2S in % d. Th.	80,01	59,20	41,61	41,81	10,08	10,80	15,10	21,85
abgesp. NH_3 in % d. Cyst. NH_3	72,64	40,50	39,73	41,94	4,84	18,15	22,1	—
N-Gehalt %	15,4	14,8	16,55	16,0	16,26	15,59	15,50	15,95
Cystingeh. %	—	4,43	5,31	4,65	7,91	6,98	6,66	6,46
S-Geh. %	1,85	2,17	2,81	2,53	3,34	3,31	3,20	2,98
Cystin-S %	—	1,17	1,41	1,24	2,11	1,66	1,77	1,72
Schädigung %	—	46,0	49,8	51,0	36,8	49,9	44,7	42,3
Wasserlöslicher Anteil:								
N-Gehalt %	15,85	16,1	15,87	16,25	15,90	15,62	15,68	15,54
Cystin %	2,32	2,61	2,32	2,02	3,20	3,25	3,35	3,08
S-Gehalt %	0,94	1,23	1,40	1,41	2,97	2,42	2,49	2,10
Cystin-S %	0,62	0,70	0,62	0,54	0,85	0,87	0,89	0,82

Tafel 10. Zusammenstellung des Gehaltes von mit Wasser geschädigten Wollen an N, S und Cystin sowie abgespalt. NH_3 und H_2S.

gehalt des nach einem Tage gewonnenen Wollepeptons nur unwesentlich höher ist, als bei den 4 bezw. 14 Tage behandelten Wollen. Hieraus folgt, daß erst eine bestimmte Anzahl von SH-Gruppen zerstört sein muß, bevor die Faserstruktur aufgegeben und ein wasserlösliches Produkt gebildet wird. Es ist aber zu betonen, daß der wasserlösliche Anteil nicht etwa aus niedermolekularen Polypeptiden besteht. Die *Fällbarkeit* mit Phosphorwolframsäure und noch mehr seine Verdaubarkeit mit Proteinasen (Trypsin, vgl. Tafel 35) sprechen dagegen.

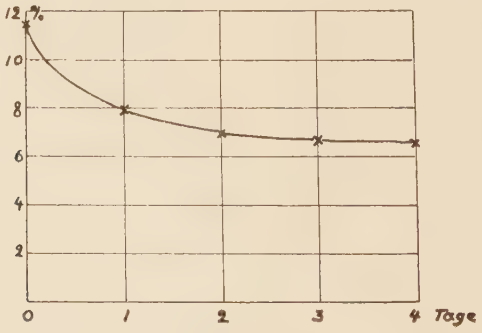


Abb. 6.

Über die Angreifbarkeit des Wollekeratins durch Alkali und Wasser läßt sich also zusammenfassend sagen: Beide Reagentien greifen in der gleichen Weise an, lediglich die Geschwindigkeit ist verschieden. Der Spaltungsmechanismus ist der gleiche wie bei Cystinpeptiden (vgl. Abschnitt 1). Die H_2S-Entwicklung und der S-Gehalt der Restsubstanz bilden kein Maß für die Spaltung der SS-Brücke. Durch die Wassereinwirkung wird der Disulfidschwefel teilweise in eine andere Form übergeführt. Das Auftreten wasserlöslicher Produkte geht auf die Sprengung von Peptidbindungen als Sekundärreaktion der SS-Spaltung zurück. Der Angriff durch Wasser stellt eine Möglichkeit dar, das widerstandsfähige Keratin einer Verdauung zugänglich zu machen.

6. Die bisher für Einkauf und Betrieb wichtigen, textilchemisch ausgewerteten Methoden zum Nachweis von *Schädigungen* an Schafwolle beschränken sich in der Hauptsache auf mechanische Festigkeitsuntersuchungen, wie Reißfestigkeit, Dehnung und Knickfestigkeit. Dabei geht man immer von Einzelfasern aus, die von Hand ausgewählt werden und deren Querschnitt jeweils gemessen werden muß. Schon daraus ersieht man, daß sich die Untersuchung auf eine kleine Anzahl von Fasern aus einer großen Wollmenge beschränken muß. *Die Diazoreaktion*, die zwar die Prüfung einer großen Durchschnittsmenge zuläßt, ermöglicht nur einen größenordnungsmäßigen Entscheid über den Umfang der Schädigung und kann feinere Unterschiede überhaupt nicht anzeigen. Wenn wir dabei noch beachten, daß eine Schädigung längs der Faser nicht gleichmäßig erfolgt, daß die Spitze meist mehr zerstört ist als die Wurzel[29]), so wird die Unzulänglichkeit der bisher benutzten Methoden noch deutlicher. Die Frage, ob man *Cystin- und Gesamtschwefel* als Kriterium einer Schädigung benutzen kann, hat also nicht nur theoretisches, sondern auch erhebliches praktisches Interesse. Als Grundlagen wurden die mit Wasser behandelten Wollen benutzt. Aus dem Cystingehalt berechnet man den Schwefelwert. Gleichzeitig bestimmt man den Gesamtschwefel. Der Gesamtschwefel ist in allen Fällen höher, da ja die SOH-Gruppe hier auf der Faser vermutlich nicht vernichtet wird unter Schwefelabspaltung, sondern als solche erhalten bleibt (vergl. Abschnitt 1) oder sich in anderer Weise stabilisiert. Man kann also den Gesamtschwefel als einen Ausdruck des ursprünglichen Cystingehaltes ansehen. Gibt man den Cystinschwefel in Prozenten des Gesamtschwefels an, so stellt die Differenz auf 100 die Anzahl der gelösten SS-Bindungen dar. Dabei ist aber zu beachten, daß die maximale Schädigung 50% nicht überschreiten kann. Ein darüber hinausgehender Schädigungsgrad würde den Zerfall der SH-Verbindung bedeuten und müßte damit ein Fallen des Schwefelwertes zur Folge haben. Tafel 8 und 10 enthalten den Schädigungsgrad für normale und für wassergeschädigte Wollen. Es zeigt sich, daß die Schädigung roher, schonend gereinigter

[29]) Vgl. *Speakman* und Mitarbeiter Soc. of Dyers and Colourists 54, 141, 159 (1938).

Schafwolle schon recht beträchtlich sein kann[30]). Auch die durch die Einwirkung von Wasser bedingten Schädigungen (Tafel 10) dagegen sind sehr bedeutend und nähern sich schon dem Maximalwert. Nach einem Tag beträgt die Wasserschädigung bereits 36,8%. Diese Anschauungen lassen sich auch auf Haare übertragen, die ja morphologisch den gleichen nur etwas gröberen Aufbau haben. Die Methode ist an einigen Beispielen praktisch überprüft worden. In Tafel 11 handelt es sich um Hauthaare und Hautwollen, die nach verschiedenen Enthaarungsverfahren gewonnen waren[31]). Hauthaare und Hautwollen sollen besonders heute bei uns möglichst ungeschädigt der industriellen Verwertung zugeführt werden.

Haar, Wolle	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*
Cystin %	7,20	9,57	10,0	4,56	10,3	9,66	10,05	10,35
Schwefel %	2,34	2,66	2,79	2,16	3,15	3,11	2,89	2,98
Cystin-S %	1,92	2,55	2,67	1,22	2,74	2,58	2,68	2,76
Schädig. %	18,0	4,1	4,4	43,5	13,0	17,0	7,2	7,5

Tafel 11. Schädigungsnachweis an Haaren und Wollen.

Muster 1 war ein nach einem neuen Verfahren der *Byk-Guldenwerke* in Oranienburg gewaschenes Haar. Muster 2 stellt ein unbehandeltes Haar dar, das einfach vom Fell abgeschnitten wurde. Muster 3 wurde nach einem Schwödeprozeß erhalten, Muster 4 dagegen durch eine Schwefelnatriumäscherung. Muster 5 bis 8 stellen Hautwollen dar, die nach ähnlichen Enthaarungsmethoden vom Fell getrennt wurden.

Tafel 12 enthält Schädigungsnachweise für Wollen, die entweder sauer oder alkalisch gewaschen worden waren. Die Waschversuche wurden von der Fa. Leipziger Wollkämmerei in Leipzig ausgeführt.

Wolle	*9*	*10*	*11*	*12*	*13*
Cystin %	11,1	10,85	10,3	10,25	10,0
Schwefel %	3,2	3,31	3,33	3,15	3,33
Cystin-S %	2,86	2,80	2,66	2,65	2,58
Schädigung %	10,6	15,4	20,1	15,9	22,5

Tafel 12. Schädigungsnachweis an Wollen.

Muster 9, 10, 11 stellen die gleiche Wollprobe dar. Muster 9 wurde mit organischen Lösungsmitteln gewaschen. Muster 10 wurde sauer, Muster 11 alkalisch gewaschen. Muster 12 wurde im Fabrikationsprozeß alkalisch und Muster 13 sauer gewaschen.

Es zeigt sich also, daß die Methode durchaus brauchbar ist, und vor

[30]) Die hohen Schädigungen bei den Wollen 5 a und 6 a bedürfen noch der Klärung. Für die Gesamtwertung des Schädigungsnachweises reicht das experimentelle Material noch *nicht* aus.

[31]) Proben der Fa. Byk-Guldenwerke AG. in Oranienburg.

allen Dingen eine quantitative Aussage über den Umfang der Schädigung zuläßt.

7. In vorliegender Arbeit wurden die für die Faserstruktur und Festigkeit von Wollfasern wesentlichen Faktoren aufgezeigt und einer der wichtigsten Faktoren der Faserverfestigung, das Cystin eingehend untersucht. Die Keratinfaser, besonders die Schafwollfaser, ist gekennzeichnet durch ihren hohen Gehalt an sauren und basischen Aminosäuren und an Cystin. COOH- und NH_2-Gruppen werden nicht vollständig zur Bildung von Peptidbindungen benötigt. Die überschüssigen sauren und basischen Gruppen können durch salzartige Bindungen eine Verfestigung der Proteinfasern untereinander verursachen. Ebenso zur Verfestigung der Faser dienen die Cystinmoleküle. Die langen Peptidketten werden so durch die Querverbindungen fest zusammengehalten und die Reißfestigkeit durch erschwertes Auseinandergleiten der Moleküle gesteigert. Daraus ergibt sich zwangsläufig, daß Wollen mit einem hohen Gehalt an Cystin, Aminodikarbonsäuren und Hexonbasen die größte Reißfestigkeit besitzen müssen. Während sich über die Festigkeit der salzartigen Bindung im Augenblick noch nichts Endgültiges aussagen läßt, ist die Stabilität der SS-Bindung geklärt. Überraschenderweise erwies sie sich labiler als bisher angenommen wurde. Damit erhebt sich die Frage, wie man die Stabilität der SS-Bindung steigern kann, oder ob es eine Möglichkeit gibt, die zu Bruch gegangenen Bindungen wieder zu verketten.

Das Cystin gegen hydrolysierende Einflüsse stabiler zu machen, scheint ziemlich ausgeschlossen. Dagegen wäre daran zu denken, die Faser oberflächlich so zu verändern, daß sie mit Wasser nicht mehr direkt in Berührung kommt. Hierbei würden jedoch eine Reihe von günstigen Eigenschaften (Dehnung und Kräuselung) verloren gehen. Der Gedanke einer Verkettung der Bruchstellen ist nicht von der Hand zu weisen. Hier ergeben sich für die gesamte Wollverarbeitung neue Gesichtspunkte. Die primär aus den Disulfidgruppen entstehenden SH-Gruppen lassen sich vielleicht mit Hilfe von Verbindungen mit reaktionsfähigen Halogenatomen *verätherm*. Würde man diese Verätherung mit Di-, Tri- und Polyhalogenverbindungen ausführen, so ließe sich ein neues Bindungsnetz über das ganze Fasermolekül spannen. Auch mit den SOH-Gruppen auf der Faser wäre an eine ähnliche Vernetzung zu denken. Wie wichtig derartige Versuche wären, illustriert Tafel 8, aus der hervorgeht, daß selbst Rohwollen nicht unbeträchtliche Schädigungen aufweisen können. Diese Schädigungen, die nach *Speakmann*[29]) vor allem auf Licht, Luft und Feuchtigkeit zurückzuführen sind, mußten bisher mit in Kauf genommen werden, ohne daß man auch nur eine Möglichkeit hatte, sich über den Umfang ein genaueres Bild zu machen. Weiterhin macht die Labilität der SS-Bindung auch die von den Färbern sehr beklagte Erscheinung des Totbrennens der Faser verständlicher. Aufbauend auf *Astburys*[32]) Streckungs-

[32]) Vgl. *Astbury*, Kolloidzeit. 83, 130 (1938).

theorie der Ringsysteme im ungestreckten Keratin macht die leichte Löslichkeit der SS-Bindung eine thioätherartige Verknüpfung der SH-Gruppe mit anderen Stellen der Faser sehr wahrscheinlich, wodurch die Fixierung der Faser in diesem gestreckten Zustand miterklärt wäre.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können dazu anregen, die Fabrikationsprozesse so zu leiten, daß eine Schädigung der Faser weitgehend ausgeschlossen ist. Dort, wo eine solche nicht ganz vermieden werden kann, wäre zu versuchen, die Schädigung durch Sekundäreingriffe zum Teil wieder aufzuheben.

Zum Abschluß soll noch ein Problem gestreift werden, das gerade in der heutigen Zeit nicht von untergeordneter Bedeutung ist. Es ist die Frage nach dem *ungeschädigten Lösen* und wieder Auspinnen von Wolle und allgemein von Keratinen[33]). Es handelt sich hier in erster Linie um die schonende Lösung der Faserquerverbindungen, um damit die sich aus dem Faseraufbau ergebende Unlöslichkeit aufzuheben. Bei der Verspinnung sollen aber gerade neue Brückenbindungen zwischen den Peptidketten erzeugt werden. Man kann hierbei die Ausbildung neuer SS-Bindungen im Auge haben. Jedoch bedingt ein hoher Cystingehalt allein selbstverständlich noch keine Faserstruktur, wie man am Beispiel des Insulins und des Metakeratins erkennen mag. Man kann aber auch daran denken, die durch Reduktion oder Hydrolyse entstandenen SH-Gruppen in hochmolekularen Eiweißstoffen so festzulegen, wie es in den vorliegenden Ausführungen gelegentlich angedeutet wurde. Eine gute Kenntnis des Naturstoffes selbst bietet immer noch die beste Gewähr für synthetische Nachahmungsversuche.

Meine Untersuchungen sind durch Stiftungen wesentlich gefördert worden, die Herrn Dr. *A. Schöberl* gemacht wurden. Ich möchte dafür der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* in *Berlin*, der *Leipziger Wollkämmerei* und der *Kammgarnspinnerei Stöhr & Co.* in *Leipzig* ergebenst danken. Die finanzielle Unterstützung durch die Leipziger Firmen erfolgte durch die freundliche Vermittlung von Herrn Dr. *E. Franz*. Ferner habe ich noch besonders der *Leipziger Wollkämmerei* und Herrn Dr. *K. Grafe* von dieser Firma für die bereitwillige Überlassung geeigneter Wollsorten vielmals zu danken.

[33]) Vgl. *K. Grafe*, Angew. Chem. 49, 303 (1936).

Experimenteller Teil.

1. COLORIMETRISCHE BESTIMMUNG VON CYSTIN UND CYSTEIN MIT 9 (18) WOLFRAMSÄURE-PHOSPHORSÄURE.

1. *Die Messung.* Benutzt wurde das *Pulfrich*'sche Stufenphotometer der Firma *Zeis*-Jena. Wir arbeiteten nach der Substitutionsmethode[34]), wobei sich bekanntlich die Einstellung der Photometerlampe auf gleiche Helligkeit erübrigt. Die Messung führte man stets mit der rechten Meßtrommel aus, während die linke entweder voll geöffnet, oder bei schwach gefärbten Lösungen etwas geschlossen wurde. Stets lagen die *abgelesenen Extinktionen* zwischen 0.6 und 1.0. Die Küvetten, deren Schichtdicke sich nach den vorhandenen Farbintensitäten richtete, kamen mit der Untersuchungs- bzw. Kompensationslösung in den linken Strahlengang des Photometers. Die gefundenen Extinktionen stellen Mittelwerte aus mindestens fünf Ablesungen dar. Die Blindwerte wurden natürlich ebenso genau gemessen wie die Farblösungen. Die abgelesenen Extinktionen rechnete man nach Abzug der eingestellten Extinktion und des Blindwertes sofort in die Extinktionskoeffizienten Ek um (s = Schichtdicke der Küvette in cm). Es wurde ausschließlich mit dem Rotfilter S 72 gemessen. Wenn möglich sind die mittleren Einstellungen vorzuziehen. Um Lichtverluste an den Küvettenfenstern zu kompensieren, vermaß man Farblösung und Blindwert stets in der gleichen Küvette. An Blindwerten waren zwei verschiedenartig zusammengesetzte Kompensationslösungen zu berücksichtigen. Der eine Blindwert ging zurück auf die ganz schwache Eigenadsorption von Lösungsmittel, Substrat und Reagenslösung (Kompensationslösung I), der andere war außerdem bedingt durch die Einwirkung von Sulfit auf das Reagens (Kompensationslösung II). Die Ek beider Kompensationslösungen sollen als bEk_I und bEk_{II} bezeichnet werden.

2. *Die Reagenzien.* Die Darstellung der Lösung von 9 (18) Wolframsäure-Phosphorsäure (im nachfolgenden als WPhS abgekürzt) wurde nach den neuesten Angaben von *O. Folin*[35]) in einer Schliffapparatur unter

[34]) Vgl. die Schrift Meß 430 d/4 der Fa. *Zeiß*, S. 35.

[35]) Journ. biol. Chem. 106, 311 (1934). Vgl. *A. Fujita*, T. Ebihara, Biochem. Ztschr. 290, 182 (1937).

genauer Einhaltung der angegebenen Bedingungen aus *molybdänfreiem* Natriumwolframat[36]) vorgenommen. Verschiedene so erhaltene Lösungen der komplexen Säure lieferten stets die gleichen Farbwerte. Die Sulfitlösung war stets frisch und 20%ig. Man löste 10 gr. kristallisiertes Natriumsulfit *(Merck,* zur Analyse) in Wasser und füllte auf 25 ccm auf. Der *Acetatpuffer* hergestellt durch Mischen von 10 Teilen 2 mol. Natriumacetatlösung und 3 Teilen 2 mol. Essigsäure, besaß ein p_H um 5,2.

3. *Die Präparate.* Als *Thioglykolsäure*präparat wurde das bequem zu handhabende Zinknatriumsalz benutzt[37]). Die vermessenen drei *Cysteinchlorhydratpräparate* sind von verschiedenen Bearbeitern aus reinem l-Cystin durch Reduktion mit Sn + HCl erhalten worden. Man löst sie mindestens zweimal aus 5n HCl um und rührt sie nach *Warburg*[38]) zur Entfernung von Schwermetallspuren gut mit Aceton durch. Das Chlorhydrat kristallisiert dabei, was immer nicht beachtet wird, mit 1 Mol *Kristallwasser.* Reinheitskontrolle durch jodometrische Titration in salzsaurer Lösung und S-Analyse. *l-Cystin* aus Schweineborsten fällte man heiß viermal aus salzsaurer Lösung mit Natriumacetat. Ferner stand inaktives Cystin zur Verfügung[39]), das ebenfalls zweimal umgefällt wurde (gef. 26,52% S, ber. 26,70% S).

4. *Die Kompensationslösungen und die Einwirkung von Sulfit auf das WPhS-Reagens.* Die Blindwerte sind für jede Versuchsreihe immer frisch bestimmt worden. Das WPhS-Reagens ist nur ganz schwach gelbgrün gefärbt. Eine vorhandene Eigenfarbe der Substratlösung (z. B. bei Eiweißhydrolysaten) muß hier ebenfalls berücksichtigt werden. Kompensationslösung I: 6,5 ccm Acetatpuffer + 2 ccm WPhS-Reagens und auf 25 ccm mit Wasser auffüllen, $t = 20^0$. Kompensationslösung II: 6,5 ccm Acetatpuffer + 1 ccm Sulfitlösung + 2 ccm WPhS-Reagens. 30 Minuten bei 20^0 stehen lassen. Dann mit Wasser auf 25 ccm auffüllen. Tafel 13 enthält die gefundenen Ek. Es sei ausdrücklich betont, daß vor allem die Sulfitblindwerte kleinen Schwankungen unterliegen[40]) und hier nur je ein Beispiel herausgegriffen wurde.

s:	*0,5*	*1*	*2*
bEk_I	0,044	0,027	0,021
bEk_{II}	0,162	0,159	0,148

Tafel 13.

Einfluß der Temperatur auf die Reaktion von Sulfit mit WPhS: 6,5 ccm Acetatpuffer + 1 ccm Sulfitlösung + 2 ccm WPhS-Reagens. Diese

[36]) Prüfung nach *O. Folin* und *H. Trimble,* Journ. biol. Chem. 60, 473 (1924).
[37]) In freundlicher Weise von der I.G. Farbenindustrie AG. Werk Mainkur überlassen.
[38]) *O. Warburg,* Biochem. Ztschr. 187, 255 (1927).
[39]) Gestiftet von der Firma *Hoffmann-La Roche* in Berlin.
[40]) Sulfit wird ja nicht analytisch genau eingewogen.

Mischung blieb 30 Minuten bei der unten angegebenen Temperatur stehen. Dann füllte man auf 25 ccm auf, ließ zum Temperaturausgleich auf 20° kommen und photometrierte in der 0,5 cm Küvette.

t =	0°	10°	15°	20°	25°	40°	50°	60°
bEk II	0,092	0,150	0,148	0,178	0,212	0,298	0,368	0,422

Tafel 14.

5. *Bestimmung von Thioglykolsäure.* Als Stammlösung diente eine m 100 Lösung in 0,2 n H_2SO_4. Das Lösungsmittel war ausgekocht und mit CO_2 gesättigt. Die Gehaltsbestimmung erfolgte durch Titration mit Jodid-Jodat. Wegen der Gefahr der Luftoxydation wurde bis zur Zugabe des WPhS-Reagenses rasch gearbeitet. *Ansätze:* Meßkölbchen mit CO_2 füllen. Substratlösung mit 0,115 bis 1,381 mg Thioglykolsäure + 6,5 ccm Acetatpuffer + 2 ccm WPhS-Reagens. 30 Minuten bei 20° stehen lassen. Dann mit Wasser auf 25 cm auffüllen, gut durchschütteln und vermessen. Bei den hohen Konzentrationen war wegen der starken Adsorption die Ablesung erschwert. Jeder Ek der Meßreihe ist mit verschiedenen Substratlösungen dreifach vermessen worden Ergebnisse in Tafel 15. Blindwerte sind berücksichtigt.

s:	2	2	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5
mg Thiogl. in 25 ccm	0,115	0,230	0,346	0,460	0,691	0,921	1,151	1,381
Mol. RSH Konzentr.	$5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1{,}5 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$6 \cdot 10^{-4}$
Ek	0,216	0,440	0,662	0,880	1,310	1,734	2,140	2,578

Tafel 15.

Bestimmung von Cystein. Zur Herstellung der 0,01 mol. Stammlösung (25 ccm) löste man 43,9 mg Cysteinchlorhydrat (lufttrocken) bei 20° in ausgekochter mit CO_2 gesättigter 0,2 n H_2SO_4. Auch hier stellt jeder Ek den Mittelwert aus 3 Ansätzen mit verschiedenen Substratlösungen dar. Bei der Vermessung der hohen Konzentrationen ergaben sich auch wegen des nicht genau gleichen Farbtones der beiden Hälften des Gesichtsfeldes Schwierigkeiten. Die erhaltenen Zahlen sind aber immerhin noch recht gut verwendbar. Bei der leichten Oxydierbarkeit des Cysteins ist hier vor allem rasches Arbeiten nötig. Die Meßkölbchen wurden stets mit CO_2 gefüllt.

A. *Ansatz ohne Sulfit.* Substratlösung + 6,5 ccm Acetatpuffer + 2 ccm WPhS-Reagens. 30 Minuten wird im Thermostaten bei 20° stehenlassen. Mit Wasser auf 25 ccm auffüllen, gut durchschütteln und vermessen. Die Bestimmungen an den verschiedenen Substratlösungen wichen maximal um ± 1% voneinander ab. Ergebnisse in Tafel 16.

s:	2	2	1	0,5	0,5	0,5	0,5
mg Cyst. in 25 ccm	0,151	0,303	0,605	0,908	1,211	1,512	1,816
Mol- RSH-Konzentr.	$5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$6 \cdot 10^{-4}$
Ek	0,197	0,407	0,832	1,265	1,693	2,141	2,581

Tafel 16.

B. *Ansatz mit Sulfit.* Substratlösung + 6,5 ccm Acetatpuffer + 1 ccm Sulfitlösung. 10 Minuten im Thermostaten bei 20° stehenlassen. 2 ccm WPhS-Reagens zugeben und wiederum bei 20° 30 Minuten lang reagieren lassen. Dann mit Wasser auf 25 ccm auffüllen, gut durchschütteln und vermessen. Die Werte stimmen bis auf 0,5% miteinander überein. Nur bei der kleinsten Cystinkonzentration betrug die Fehlerbreite ± 2%. Die Farblösungen sind gegen Kompensationslösung I und II photometriert worden. Tafel 17 enthält die Ergebnisse.

s:	1	1	0,5	0,5
mg Cystin in 25 ccm	0,151	0,303	0,605	0,908
Mol. RSH-Konzentration	$5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4}$
Ek (bEk_{II} abgezogen)	0,312	0,759	1,632	2,489
Ek (bEk_{I} abgezogen)	0,450	0,896	1,775	2,631

Tafel 17.

7. *Bestimmung von Cystin.* Stammlösung war auch hier eine 0,01 mol. Cystinlösung in 0,2 n H_2SO_4, die in 1 ccm 2,302 mg Cystin enthielt. Durch Verdünnung bereitete man daraus 0,002 und 0,001 mol. Cystinlösungen. 1,8 bis 0,9 mg Cystin pro Ansatz können in der 0,5 Küvette, 0,9 bis 0,4 mg in der 1 cm-Küvette und schließlich 0,4 bis etwa 0,06 mg in der 2 cm-Küvette vermessen werden. Auch hier wurden wieder drei verschiedene Cystinstammlösungen zur Festlegung jedes Ek benutzt. Dabei betrugen bis herab zu 0,48 mg Cystin pro Ansatz bei den einzelnen Messungen die Unterschiede nur ± 0,5%. Noch geringere Konzentrationen ergaben naturgemäß eine etwas größere Fehlerbreite. Man konnte aber trotzdem noch bis $1 \cdot 10^{-5}$ mol. gut messen. Bei den höchsten Cystinkonzentrationen waren die Ablesungen aus schon erwähnten Gründen erschwert, zuweilen sah man auch Trübungen durch bereits ausgefallenes Cystin. Am vorteilhaftesten sind 0,5 bis 1,2 mg Cystin in einem Ansatz mit 25 ccm. Ansätze: Substratlösung (bei hoher Mineralsäurekonzentration, z. B. bei Eiweißhydrolysaten, ist Neutralisation mit NaOH nötig) + 6,5 ccm Acetatpuffer + 1 ccm Sulfitlösung. 10 Minuten im Thermostaten bei genau 20° reagieren lassen. 2 ccm WPhS-Reagens zugeben und wieder bei genau 20° 30 Minuten stehen lassen. Dann auf 25 ccm mit Wasser auffüllen, tüchtig durchschütteln und vermessen. Es

wurde wiederum gegen Kompensationslösung II und I verglichen. Ergebnisse in Tafel 18.

s:	2	2	2	1	1
mg Cystin in 25 ccm	0,060	0,120	0,240	0,360	0,480
Mol. Konzentr.	$1 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-5}$	$6 \cdot 10^{-5}$	$8 \cdot 10^{-5}$
Ek (bEk_{II} abgezogen)	0,018	0,043	0,178	0,339	0,516
Ek (bEk_{I} abgezogen)	0,141	0,167	0,298	0,465	0,643

s:	1	0,5	0,5	0,5	0,5
mg Cystin in 25 ccm	0,600	0,901	1,201	1,502	1,802
Mol. Konzentr.	$1 \cdot 10^{-4}$	$1{,}5 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$2{,}5 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4}$
Ek (bEk_{II} abgezogen)	0,693	1,143	1,577	2,027	2,420
Ek (bEk_{I} abgezogen)	0,818	1,265	1,699	2,148	2,547

Tafel 18.

Zur Orientierung über die *Fehlerbreite* bei den mittleren Messungen diene die folgende Zusammenstellung:

0,908 mg Cystein
Lösung 1: Ek = 1,256 Lösung 2: Ek = 1,264 Lösung 3: Ek = 1,276
0,303 mg Cystein (mit Sulfit)
Lösung 1: Ek = 0,763 Lösung 2: Ek = 0,749 Lösung 3: Ek = 0,764
0,480 mg Cystin
Lösung 1: Ek = 0,518 Lösung 2: Ek = 0,516 Lösung 3: Ek = 0,514

8. *Einfluß der Temperatur auf die Bestimmung von Cystin.* Als Substratlösungen dienten verschiedene 0,01 mol. Cystinlösungen in 0,2 n H_2SO_4, von denen jeweils 0,25, 0,375, 0,5, 0,625 und 0,75 ccm verwandt wurden. Nach Zugabe der 6,5 ccm Acetatpuffer setzte man die Sulfitlösung zu (in den Bestimmungen 1 mit 4 0,5 ccm, sonst 1 ccm) und ließ 10 Minuten stehen. Dann gab man 2 ccm WPhS-Reagens zu und wartete 30 Minuten. Anschließend wurde auf 25 ccm aufgefüllt, gut durchgeschüttelt und in der 0,5 cm Küvette gemessen. Zu den Bestimmungen bei Zimmertemperatur sind verschiedene Cystinlösungen benutzt worden. Die Messungen 2 mit 4 und 5 mit 7 zeigen untereinander nur geringe Abweichungen, da sie jeweils an einem Tage ausgeführt wurden, wobei die Temperaturunterschiede nicht sehr groß sein konnten. Die Ansätze bei konstanter Temperatur ließ man in einem Thermostaten während der Reaktionsdauer (10 + 30 Minuten) durchreagieren, füllte dann auf 25 ccm auf und brachte zum Temperaturausgleich auf 20° (in etwa 20 Minuten). Anschließend wurde photometriert. Bei den Bestimmungen 8c und 10a ließ man diesen Temperaturausgleich n i c h t eintreten, sondern füllte mit Wasser von Zimmertemperatur auf und kolorimetrierte sofort.

Mol. Konz. mg Cystin	$1 \cdot 10^{-4}$	$1{,}5 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$2{,}5 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4}$	Temp. ° C	Vers. Nr.
in 25 ccm	0,600	0,901	1,201	1,502	1,802		
	0,806	1,226	1,666	2,026	2,486		1
	0,778	1,098	1,312	1,438	1,758		2
	0,800	1,150	1,326	1,484	1,752		3
	0,794	1,128	1,342	1,494	1,762		4
	0,688	1,130	1,570	2,000	2,330		5
	0,693	1,115	1,575	2,015	2,427		6
	0,823	1,157	1,589	2,023	2,387		7
	0,812	1,238	1,645	1,824	2,190	0	8a
	0,867	1,294	1,701	1,880	2,245	0	8b
	0,740	1,004	1,154	1,362	1,592	0	8c
	0,794	—	1,614	—	2,222	10	9a
	0,904	—	1,724	—	2,332	10	9b
	0,744	1,188	1,626	2,002	2,344	15	10a
Ek	0,848	1,292	1,730	2,096	2,448	15	10b
	0,714	1,142	1,574	2,028	2,422	20	11a
	0,836	1,254	1,696	2,150	2,544	20	11b
	0,702	1,120	1,564	2,066	2,456	20	11c
	0,714	1,140	1,581	1,994	2,347	20	11d
	0,643	1,097	1,512	1,974	2,424	25	12a
	0,812	1,266	1,681	2,142	2,593	25	12b
	0,550	0,960	1,378	1,824	2,228	40	13a
	0,804	1,214	1,632	2,078	2,482	40	13b
	0,399	—	1,147	—	1,953	50	14a
	0,710	—	1,458	—	2,110	50	14b
	0,271	0,590	1,010	1,472	1,879	60	15a
	0,643	0,956	1,382	1,838	2,251	60	15b

Tafel 19.

Es wurde also hier bei tieferer Temperatur abgelesen. Bei den Bestimmungen 11d ist die freie H_2SO_4 vor Zugabe der Pufferlösung mit 0,1 n NaOH neutralisiert worden. Hierbei entstanden bei den höchsten Konzentrationen ab und zu, vermutlich durch ausfallendes Cystin Trübungen. Die Versuche 11c enthielten neben Sulfit noch 1 ccm 1 mol. Na_2SO_4-Lösung. Bei der Versuchsreihe 2 bestimmte man 1,502 mg Cystin bei Sättigung mit Luft bezw. mit CO_2. Ek war 1,428 bzw. 1,424. Ersatz der Sulfitlösung durch eine 1 mol. bzw. 2 mol. Bisulfitlösung (jeweils 1,5 ccm) brachte auch keine prinzipielle Änderung der Farbstärke bei Zimmertemperatur. Die Ergebnisse finden sich in Tafel 19. Vgl. zum Teil auch Abb. 2 und 3. Im allgemeinen ist vom Ek der Blindwert bEk_{II} abgezogen. Nur bei den mit b bezeichneten Auswertungen wurde von den in den Versuchen 8a, 9a, 10a, 11a, 12a, 13a, 14a und 15a gefundenen Ek bEk_I abgezogen.

Abhängigkeit der Farbstärke von der Sulfitkonzentration. Ansätze wie oben beschrieben bei Zimmertemperatur mit verschiedenen Mengen von Sulfitlösung. Verwendet wurden 0,5 ccm einer 0,01 mol. Substratlösung = 1,201 mg Cystin. Ergebnisse in Tafel 20.

ccm Sulfitlösung	0,5	1	1,5	2	2,5
bEk_{II}	0,110	0,192	0,338	0,332	0,436
Ek (bEk_{II} abgezogen)	1,312	1,548	1,370	1,376	1,188
Ek (bEk_{I} abgezogen)	1,378	1,696	1,664	1,664	1,580

Tafel 20.

2. BESTIMMUNG VON CYSTIN UND SCHWEFEL IN SCHAFWOLLE.

1. *Reinigung roher Schafwolle.* Rohe Schafwolle[41]), wie sie bei der Schur anfällt, wurde im Soxhlet zunächst zweimal mit Methylalkohol je 6 Stunden extrahiert, um den größten Teil des Wollfettes und die auf der Faser haftende Feuchtigkeit zu entfernen. Die sich anschließende zweimalige je 6stündige Extraktion mit Äther entfernte dann den Rest des Wollfettes. Eine Schädigung der Faser konnte nicht eintreten, da die Extraktionsapparate so bemessen waren, daß eine Erhitzung des Extraktionsgutes vermieden wurde. Zur Entfernung der auf der Faser haftenden anorganischen Salze und Verunreinigungen wurde die von Fett befreite Wolle so lange mit destilliertem Wasser gewaschen, bis das Wasser klar ablief. Nun schüttelte man die Wolle mit anfänglich 40° warmem Wasser, das öfters erneuert wurde, 12 bis 16 Stunden auf der Schüttelmaschine. Der größte Teil des Waschwassers wurde auf der Zentrifuge abgeschleudert, um eine Streckung der Faser im nassen Zustande zu vermeiden. Anschließend blieb die Wolle so lange an einem kühlen Ort liegen, bis sie die normale Luftfeuchtigkeit angenommen hatte. Die Entfernung der groben Verunreinigungen (Dornen, Disteln, Samen) erfolgte von Hand. Nach nochmaligem Waschen in der oben angegebenen Weise war die Wolle für die Versuche verwendbar.

Eine zweite Reinigungsart führte zum gleichen Ergebnis. Diesmal wurde zum Entfetten Petroläther verwendet, der das Wollfett besser löste als Methanol und Äther. Die Rohwolle wurde je zweimal 6 Stunden lang extrahiert. Anschließend wusch man mit Wasser bis zur Entfernung anorganischer Verunreinigungen und trocknete nach vorherigem Zentrifugieren an der Luft. Nach diesem Arbeitsgang wurden die groben Verunreinigungen mit der Hand entfernt. Auf eine weitere 6stündige Extraktion mit Methanol und darauffolgende 6stündige Behandlung mit Äther folgte ein 16 Stunden langes Durchschütteln mit warmem Wasser, das mehrfach erneuert wurde. Der Reinheitsgrad wurde durch Aschebestimmung geprüft.

[41]) Material der Leipziger Wollkämmerei.

2. *Cystinbestimmungen an Schafwolle. Feuchtigkeitsbestimmung.* In einem Wägegläschen wurden 600—900 mg Wolle bei bekannter Luftfeuchtigkeit und Temperatur eingewogen. Darauf brachte man das Wägegläschen samt Inhalt in eine Trockenpistole mit P_2O_5 und trocknete im Hochvakuum (0,2 mm) bei 68° bis zur Gewichtskonstanz, was durchschnittlich in drei bis vier Stunden der Fall war. Nach dem Erkalten in der Pistole nahm man das Gläschen so schnell wie möglich heraus und verschloß sofort, da trockene Wolle äußerst schnell Wasser anzieht. Nach der Wägung ließ sich aus der Differenz der Wassergehalt in Prozenten angeben. Es zeigte sich, daß Wolle verschiedener Herkunft selbst bei gleicher Luftfeuchtigkeit und Temperatur verschiedenen Wassergehalt aufweist. In Tafel 21 ist der Wassergehalt in Prozenten für verschiedene Wollsorten angegeben.

Wolle	5a	8a	5a	6b	5b	5b	8a
Relative Feuchtigkeit %	59	63	67	68	68	69	70
Temperatur ° C	23	24	22	24	22	24	24
H_2O-Gehalt %	10,0	10,3	11,1	11,1	11,5	11,3	11,5

Wolle	5a	6a	11b	11b	8a*)	5b
Relative Feuchtigkeit %	71	72	74	76	76	77,5
Temperatur ° C	23	24	16	21	15	20
H_2O-Gehalt %	11,5	11,9	13,1	12,7	13,1	13,3

Tafel 21.

Entfärbung der Hydrolysate von Schafwolle. Entfärbung mit Tierkohle. 1,6493 gr. trockene Schafwolle[42]) wurden mit 6 n H_2SO_4 hydrolysiert. (vgl. weiter unten). Ansatz ohne vorherige Entfärbung. Von dem auf 100 ccm aufgefüllten Hydrolysat wurde 1 ccm entnommen und mit n-NaOH neutralisiert. Nach Zusatz von 13,0 ccm Acetatpuffer (p_H 5,2) wurde mit 2 ccm 20%iger Sulfitlösung aufgespalten und nach 10 Minuten 4 ccm WPhS-Reagens zugegeben. Nach 30 Minuten füllte man auf 50 ccm auf und kolorimetrierte anschließend. s = 0,5, Ek = 1,51, bEk = 0,082. Cystingehalt in einem ccm Hydrolysat: 2,05 mg, also in 100 ccm 205,0 mg = *12,44% Cystin.* Der Rest des Hydrolysates wurde mit 500 mg Tierkohle 30 Minuten lang geschüttelt. Dabei trat vollständige Entfärbung ein. *Farbansatz nach der Entfärbung.* 1 ccm des Hydrolysates wurden mit n-NaOH neutralisiert und der Ansatz wie oben beschrieben ausgeführt. s = 0,5, Ek = 1,370, bEk = 0,082, Ekb = 1,288. Cystingehalt in 1 ccm 1,85 mg also in 100 ccm 185,0 mg = *11,2% Cystin.*

*) Geschädigt durch 14-tägige Behandlung mit heißem Wasser.

[42]) Bei den Einwaagen wird stets das Gewicht der wasserfreien Wolle angegeben.

Entfärbung mit Kaolin. 1,3233 gr. Wolle wurden wie üblich hydrolysiert und auf 100 ccm aufgefüllt. Cystingehalt vor der Entfärbung: 1 ccm Hydrolysat wurde mit n-NaOH neutralisiert und damit der Farbansatz ausgeführt. s = 0,5, Ek = 1,17, bEk = 0,082, Ekb = 1,088. Cystingehalt in 1 ccm: 1,561 mg also in 100 ccm 156,1 mg = *11,8% Cystin.*

Das restliche Hydrolysat wurde mit 500 mg Kaolin 30 Minuten geschüttelt und nitriert. Dabei trat nur eine Aufhellung, aber keine Entfärbung ein. 1 ccm wurde zum Farbansatz wie oben verwendet. s = 0,5, Ek = 1,15, bEk = 0,082, Ekb = 1,068. Cystin in 1 ccm Hydrolysat: 1,531 mg also in 100 ccm 153,1 mg = *11,59% Cystin.*

Es tritt also in beiden Fällen ein merklicher Verlust an Cystin auf, so daß es zweckmäßig ist, nicht zu entfärben.

Beständigkeit von Cystin in schwefelsaurer Lösung. 10 ccm 0,01-m *Cystin*lösung (24,02 mg) wurden mit 10 ccm 6-n H_2SO_4 6 Stunden bei 125° Badtemperatur gekocht. Dann füllte man auf 50 ccm auf und filtrierte. 2 ccm Substratlösung wurden mit n-NaOH neutralisiert und der Farbansatz in 25 ccm-Kölbchen ausgeführt[43]). s = 0,5, Ek = 1,336 (1,356), bEk = 0,160 (0,160), Ekb = 1,176 (1,196). Mittelwert: 1,186 = 0,930 mg Cystin in 2 ccm Substratlösung also in 50 ccm *23,2 mg Cystin.*

Beeinflussung der Cystinbestimmung durch andere Aminosäuren. Um den Einfluß anderer Aminosäuren bei der Säurehydrolyse und bei der Reduktion der WPns zu studieren, setzte man der Cystinlösung reinste, schwefel- und cystinfreie Gelatine zu und hydrolysierte 6 Stunden lang. Ansatz: 10 ccm 0,01-m Cystinlösung (24,02 mg) + 10 ccm 6-n H_2SO_4 + etwa 1 g Gelatine. 6 Stunden bei 125° hydrolysieren. Es wurde gleichzeitig geprüft, ob Fehler durch Adsorption an Papierfiltern eintreten können. Das Hydrolysat wurde auf 50 ccm aufgefüllt und davon 2 ccm zum Farbansatz verwendet.

a) *Verwendung von Glasfiltern.* Substrat 2 ccm mit n-NaOH neutralisiert. s = 0,5, Ek = 1,400 (1,390), bEk = 0,168 (0,168), Ekb = 1,232 (1,222). Mittelwert: 1,227 = 0,964 mg Cystin in 2 ccm Substrat, also in 50 ccm: 24,1 mg (ber. 24,02).

Kontrollansatz: Vgl. oben. s = 0,5, Ek = 1,400 (1,390), bEk = 0,168 (0,168), Ekb = 1,232 (1,222). Mittelwert: 1,227 = 0,964 mg Cystin in 2 ccm Substrat also in 50 ccm 24,1 mg (ber. 24,02).

b) *Verwendung von Papierfiltern.* Hydrolysenansätze und kolorimetrische Bestimmung wie oben. Ekb = 1,224 (1,226). Mittelwert: 1,225 = 0,962 mg Cystin in 2 ccm Substrat also im Gesamtvolumen 24,05 mg (ber. 24,02 mg).

3. *Geschwindigkeit der Säurehydrolyse von Schafwolle.* Gereinigte Schafwolle wurde bei bekannter Luftfeuchtigkeit und Temperatur in einem Glasröhrchen (8 cm lang, 12 mm Durchmesser) auf 0,1 mg genau abgewogen. Von diesem Gewicht zog man den in einer getrennten Probe

[43]) Alle folgenden Cystinbestimmungen wurden in 25-ccm-Kölbchen ausgeführt.

ermittelten Feuchtigkeitsgehalt ab. Die Wolle stieß man dann mittels eines Glasstabes aus dem Glasröhrchen unmittelbar in das Hydrolysenkölbchen (100 ccm Schliffkölbchen mit Rückflußkühler). Nun gab man zu der stets gewählten Einwaage von etwa 400 mg Wolle 10 ccm 6-n H_2SO_4 und hydrolysierte in einem Thermostaten bei 125° Badtemperatur. In bekannten Zeitabständen wurden 0,5 ccm Hydrolysat entnommen, wobei man Sorge trug, daß möglichst wenig Wasser verdunstete und führte damit Bestimmungen des freien Aminostickstoffes nach *van Slyke* durch. Die Stickstoffwerte sind in Tafel 22 und 23 zusammengestellt.

Zeit in Minuten	60	120	240	320	425
NH_2-N in %[44])	46,1	57,5	72,0	82,0	84,9

Tafel 22.

Zeit in Minuten	80	135	190	275	380	505
NH_2-N in %	49,2	57,0	64,0	75,0	84,5	87,5

Tafel 23.

Geschwindigkeit der Säurehydrolyse bei gleichzeitiger Bestimmung von Amino- und Disulfidgruppen. Um den Verdunstungsverlust während der Probeentnahme zu vermeiden, wurden für jeden Wert getrennte Ansätze gemacht. Dabei zeigten sich Schwankungen in den Cystinwerten, die nur auf die Uneinheitlichkeit des Materials zurückzuführen waren, da sich bei der Verwendung verschiedener Wollen das gleiche Bild ergab. Ergebnisse in Tafel 24.

Wolle	Zeit in Std.	2	4	6	8	10	12
5a	% NH_2-N	61,0	77,0	77,9	79,0	82,0	87,0
	% Cystin	7,47	7,90	7,90	7,62	7,93	7,95
5b	% NH_2-N	51,9	67,0	71,5	77,0	78,6	81,6
	% Cystin	11,3	11,4	11,3	11,2	10,6	10,6

Tafel 24.

Um diesen Fehler zu umgehen, wurde das Hydrolysat, nachdem es in Lösung gegangen war (etwa 1 Stunde), auf 25 ccm verdünnt und davon jeweils 5 ccm zur weiteren Hydrolyse verwandt. Die Ergebnisse für Wolle 6a findet sich in Tafel 25.

Zeit in Stunden	2	4	6	8	10	12
% NH_2-N	58,2	68,3	75,5	76,5	79,8	86,5
% Cystin	9,96	9,84	10,04	10,2	10,2	10,4

Tafel 25.

[44]) Der Aminostickstoff ist in Prozenten des Gesamtstickstoffes angegeben.

Änderung am Hydrolysenkölbchen: Um eine Probeentnahme zu gewährleisten, bei der keine Verdunstungsverluste auftreten und auch der Kühler nicht abgenommen zu werden brauchte, wurde das Kölbchen mit einem seitlichen Tubus versehen, durch den das Hydrolysat in Zeitabständen herausgenommen werden konnte. Ergebnisse für Wolle 5b in Tafel 26.

Zeit Stdunden	2	4	6	8	10	12	14
% Cystin	11,0	11,0	11,0	11,1	11,35	11,45	11,45
% NH_2-N	42,2	56,4	66,5	73,5	80,5	82,0	82,0

Tafel 26[45]).

Cystinwerte verschiedener Wollen in Abhängigkeit von der Hydrolysendauer. Die Hydrolysen wurden in den eben beschriebenen Kölbchen mit seitlichem Tubus ausgeführt. Tafel 27 enthält den ermittelten Cystingehalt in Prozenten.

Wolle	*Zeit Std.*	1	2	4	6	8	10	12	18	24	26
5a	% Cystin	7,83	7,92	8,01	7,92	7,92	8,01	7,92	—	—	—
5b	% Cystin	11,08	11,01	10,92	11,48	11,48	11,10	10,52	—	—	—
5b	% Cystin	10,20	10,20	—	—	10,90	—	10,55	10,9	10,2	—
6a	% Cystin	10,20	10,20	10,30	10,30	10,30	10,30	10,30	—	—	—
6b	% Cystin	—	11,71	11,71	11,71	11,71	11,71	11,78	—	—	—
8a	% Cystin	—	11,50	11,50	11,62	12,00	11,50	11,62	10,78	—	9,69

Tafel 27.

Cystinbestimmung in Einzelansätzen bei Verwendung einer sorgfältig gereinigten und gemischten Wolle. Versuche für Wolle 11b in Tafel 28.

Zeit in Std.	1	2	4	6	8	10
% Cystin	10,90	10,84	10,79	11,11	10,81	11,20
% Cystin	11,00	10,78	10,79	10,66	10,81	10,78
Mittelwert	10,95	10,81	10,79	10,88	10,81	10,95

Tafel 28.

Hydrolyse von Edestin in Tafel 29.

Zeit in Stunden	1	5	12
% Cystin	1,28	1,39	1,41

Tafel 29.

Hydrolyse von Albumin in Tafel 30.

Zeit in Stunden	1	2	5	9	12
% Cystin	2,23	2,22	2,39	2,55	2,64

Tafel 30.

[45]) Vgl. Fig. 4.

4. *Schwefelbestimmungen in Schafwolle.*

Einwaage: Zur Einwaage verwandte man luftfeuchte Wolle, deren Feuchtigkeitsgehalt in einer getrennten Probe ermittelt wurde. Als Wägegläschen dienten 6 cm lange Quarzröhrchen, deren Durchmesser so bemessen war, daß sie in das Quarzrohr der Schwefelbestimmungsapparatur nach *Grote* und *Krekeler* eingeführt werden konnten.

Verbrennung: Die Verbrennung erfolgte in der von *Grote* und *Krekeler* angegebenen Apparatur, die von *Schöberl* auf Halbmikroverhältnisse umgearbeitet worden war[24]). Hier bot das Quarzröhrchen neben der leichten Handhabung der Wolle einen wirksamen Schutz des Quarzrohres gegen den geringen Phosphorgehalt der Wolle, der zu einem frühzeitigen Mattwerden des Rohres Anlaß geben würde. Verbrannt wurde bei sehr lebhaftem Luftstrom (120—150 Blasen in der Minute), indem man zunächst durch vorsichtiges Erhitzen die vergasbaren Zersetzungsprodukte aus der Wolle austrieb, um schließlich mit scharfer Flamme, etwa unter Zuhilfenahme eines Asbestschirmes, den Kohlerückstand ganz zu verbrennen. Nach dem Durchglühen des Rohres wurde die Vorlage ausgespült und die Schwefelsäure entweder mit $BaCl_2$ gefällt oder konduktometrisch titriert. Die Fällung erfolgte wie üblich in der Hitze nach dem Ansäuern durch tropfenweise Zugabe von $BaCl_2$. Abfiltriert wurde im Porzellanfiltertiegel.

Konduktometrische Titration.

Die Apparatur. Verwandt wurde das von Jander und Pfund angegebene Konduktometer für visuelle Leitfähigkeitstitration[46]), wie es von der Fa. Ruhstrat in Göttingen geliefert wird.

Das Leitfähigkeitsgefäß hatte einen Durchmesser von 45 mm und einen Elektrodenabstand von 30 mm bei einer Elektrodenfläche von 20×25 mm. Das Gefäß faßt 100 ccm Flüssigkeit und ist mit einem Ablaßhahn versehen. Ein mechanischer Rührer sorgt für Durchmischung. Das Galvanometer ist in 20 Teilstriche geteilt, deren jeder bei maximaler Empfindlichkeit $2{,}8 \cdot 10^{-6}$ Amp. darstellt. Die Meßschaltung gestattet eine Regulierung der Meßspannung von 0 bis 12 Volt und eine Empfindlichkeitsregelung von 0 bis 10. Der Vergleichswiderstand kann beliebig gewählt werden. Für die Titration des Sulfations wurde mit maximaler Empfindlichkeit und einer Meßspannung von 12 Volt gearbeitet. Der Vergleichswiderstand betrug 1000 Ohm.

Die Bürette ist in 0,02 ccm geteilt und faßt ohne Vorratsgefäß 5 ccm Lösung. Als Titrationsflüssigkeit wird $Ba[CH_3COO]_2$-Lösung gewählt, die in Anbetracht der kleineren Wanderungsgeschwindigkeit des Acetations die günstigere Kurvenform gibt. Die Lösung enthielt im Liter 13,71 g $Ba[CH_3COO]_2$, was einem Schwefelgehalt von 1,72 g entspricht. Als Urtiter diente eine 0,1-n H_2SO_4 oder eine $2{,}9 \cdot 10^{-2}$ mol. $[NH_4]_2SO_4$-Lösung, deren Schwefelgehalt gravimetrisch ermittelt wurde.

---

[46]) Vgl. Die visuelle Leitfähigkeitstitration und Leitfähigkeitsmessung. Verl. *F. Enke,* Stuttgart.

Ausführung der Titration. Die zu titrierende Lösung wurde im Titriergefäß mit 50 ccm 50%igem Äthylalkohol versetzt und dann auf 100 ccm verdünnt. War die Lösung sauer, so neutralisierte man ungefähr mit n-NH_4OH. Enthielt die Lösung Wasserstoffsuperoxyd, so verdünnte man erst mit Alkohol, nachdem sich dieses an den platinierten Platinelektroden zersetzt hatte. Man kann das Wasserstoffsuperoxyd auch vor dem Einfüllen in das Titriergefäß bei Gegenwart von platiniertem Platin zersetzen. Weit besser erwies sich die Zersetzung mit einer Spur Braunstein in ammoniakalischer Lösung. Die Titration erfolgte nach der Ausschlagmethode, d. h. man stellte die Meßbrücke so ein, daß das Galvanometer etwa auf Teilstrich 18 stand. Man gab jetzt jeweils 0,5 ccm $Ba[CH_3COO]_2$-Lösung zu und registrierte den Ausschlag des Galvanometers, der zunächst zurückgeht, bis der Äquivalenzpunkt erreicht ist und dann sehr schnell wieder ansteigt. Die Ausschläge wurden in Abhängigkeit von der zugegebenen $Ba[CH_3COO]_2$-Lösung aufgetragen, die beiden Kurvenäste bis zum Schnittpunkt verbunden und die dazugehörigen ccm $Ba[CH_3COO]_2$-Lösung abgelesen. Der so gefundene Wert stellt damit die zur Fällung aller SO_4-Ionen notwendige Menge an $Ba[CH_3COO]_2$ dar. Als Testsubstanzen wurden analysiert: Taurin: 25,62% S, ber. 25,62% S. Cystin 26,9% S, ber. 26,7% S.

5. *Gesamtanalysen der benutzten Wollsorten.*

Wolle 5a, S-Bestimmung:

Einwaage in gr.	0,4622	0,6320	0,5147
$BaSO_4$ in gr.	0,1031	0,1346	0,1085
Schwefel in gr.	0,0142	0,0185	0,0149
Schwefel in %	3,06	2,93	2,90

Mittelwert: 2,96% S

N-Bestimmung[47]: Einwaage: 6,66 mg (4,66) 0,01-n HCl: 7.07 ccm (4,87), Stickstoff: 0,991 mg (0,682), Stickstoff: 14,9% (14,7), *Mittelwert: 14,8% N.*

Cystinbestimmung: Mittelwert aus 9 Bestimmungen: 7,75% Cystin.

Wolle 5b, S-Bestimmung:

Einwaage in gr.	0,2214	0,2502	0,4484
$BaSO_4$ in gr.	0,0535	0,0579	0,1096
Schwefel in mg	7,35	7,95	15,05
Schwefel in %	3,32	3,18	3,38

Mittelwert: 3,29% S

N-Bestimmung: Einwaage: 5,38 mg (5,07), 0,01-n HCl: 6.67 ccm (6,36), Stickstoff: 0,934 mg (0,891), Stickstoff 17,4% (17,6), *Mittelwert 17,5% N.*

Cystinbestimmung: Mittelwert aus 14 Bestimmungen: *11,1% Cystin.*

[47]) Stets nach Mikro-*Kjeldahl.* Einwaage um 150 mg veraschte man mit 5 ccm c. H_2SO_4, verdünnt auf 25 ccm und nahm davon einen aliquoten Teil (vgl. Dissertation *Th. Hornung,* Würzburg 1938).

Wolle 6a, S-Bestimmung:

Einwaage in gr.	0,6549	0,6171	0,5984
$BaSO_4$ in gr.	0,1924	0,1837	0,1675
Schwefel in mg	26,41	25,21	23,00
Schwefel in %	4,04	4,08	3,85

Mittelwert: 3,99% S

N-Bestimmung: Einwaage: 6,46 mg (5,11), 0,01-n HCl: 7,05 ccm (5,60), Stickstoff: 0,986 mg (0,784), Stickstoff: 15,30% (15,30), *Mittelwert: 15,3% N.*

Cystinbestimmung: Mittelwert aus 13 Bestimmungen: *10.20% Cystin.*

Wolle 8a, S-Bestimmung:

Einwaage in gr.	0,7804	0,7630	0,4937
$BaSO_4$ in gr.	0,2058	0,1987	0,1309
Schwefel in mg	28,25	27,35	17,99
Schwefel in %	3,61	3,59	3,65

Mittelwert: 3,61% S

N-Bestimmung: Einwaage: 5,82 mg (6,49), 0,01-n HCl: 7,21 ccm (7,86), Stickstoff: 1,01 mg (1,10), Stickstoff: 17,4% (17,0), *Mittelwert: 17,2% N.*

Cystinbestimmung: Mittelwert aus 6 Bestimmungen: *11.8% Cystin.*

Wolle 8b, S-Bestimmung:

Einwaage in gr.	0,6975	0,9142	0,7885
$BaSO_4$ in gr.	0,2006	0,2574	0,2204
Schwefel in mg	27,55	35,35	30,30
Schwefel in %	3,95	3,87	3,85

Mittelwert: 3,89% S

N-Bestimmung: Einwaage: 5,56 mg (6,68), 0,01-n HCl: 6,19 ccm (7,25), Stickstoff: 0,866 mg (1,014), Stickstoff: 15,6% (15,2), *Mittelwert: 15,4% N.*

Cystinbestimmung:

Einwaage in gr.	1,1871	1,3233	1,6493
Cystin in gr.	0,1385	0,1561	0,2050
Cystin in %	11,67	11,80	12,40

Mittelwert: 11,96%.

Wolle 10b, S-Bestimmung:

Einwaage in gr.	0,5627	0,5144	
$Ba(CH_3COO)_2$ ccm	11,82	10,65	
Schwefel in mg	20,35	18,32	
Schwefel in %	3,61	3,57	*Mittelwert: 3,59%.*

N-Bestimmung: Einwaage: 7,00 mg (7,32), 0,01-n HCl: 8,23 ccm (8,36), Stickstoff: 1,15 mg (1,17), Stickstoff: 16,45% (16,05), *Mittelwert: 16,30% N.*

Cystinbestimmung: Einwaage: 0,2052 gr. (0,2789), Cystin: 23,25 mg (32,50), Cystin: 11,35% (11,60), *Mittelwert: 11,48% Cystin.*

Wolle 11 b. S-Bestimmung: Einwaage: 0,3300 gr. (0,4979), $Ba[CH_3COO]_2$: 5,5 ccm (8,5 ccm), Schwefel: 9,15 mg (14,6), Schwefel: 2,86% (2,94), *Mittelwert: 2,90% S.*

N-Bestimmung: Einwaage: 7,19 mg (7,99), 0,01-n HCl: 8,39 ccm (9,66), Stickstoff: 1,17 mg (1,35), Stickstoff: 16,3% (1,91), *Mittelwert: 16,59% N.*

Cystinbestimmung: Mittel aus 11 Bestimmungen: *10,87%.*

Wolle 12. S-Bestimmung: Einwaage: 0,5716 gr. (0,6262), $BaSO_4$: 0,1485 gr. (0,1588), Schwefel: 20,01 mg (21,80), Schwefel: 3,56% (3,48), *Mittelwert: 3,52% S.*

N-Bestimmung: Einwaage: 5,75 mg (7,61), 0,01-n HCl: 6,40 ccm (8,23), Stickstoff: 0,90 mg (1,15), Stickstoff: 15,55% (15,15), *Mittelwert: 15,35% N.*

Cystinbestimmung: Einwaage: 1,1881 g (0,8116, 1,2552), Cystin: 0,1320 gr. (0,0906, 0,1420), Cystin: 11,15% (11,15%, 11,3%); *Mittelwert: 11,20%.*

3. EINWIRKUNG VON ALKALIEN AUF CYSTINDERIVATE.

Beschreibung der Spaltversuche. Die Spaltungen wurden ausnahmslos unter Ausschluß des Luftsauerstoffes ausgeführt. Als indifferentes Gas wurde Stickstoff verwandt, dem kleine Mengen von Wasserstoff zugemischt waren.

1. *Reinigung des Stickstoffes.* Der aus einer Stahlflasche entnommene Stickstoff wurde zur Entfernung der größten Menge beigemischten Sauerstoffes über eine etwa 1 m lange Schicht von Kupferspänen geleitet, die im elektrischen Ofen auf 500° erhitzt wurden (Temperaturkontrolle). Zur Regeneration des verbrauchten Kupfers setzte man dem N_2 in kleinen Anteilen Wasserstoff zu. Nach dieser Vorreinigung gelangte das Gas in einen mit Chromosulfat gefüllten Absorptionsturm, in dem die letzten Spuren Sauerstoffes entfernt wurden. Spuren von Schwefelwasserstoff entfernte man durch zwei Waschflaschen mit alkalischer Plumbitlösung. Die Verbindungsstücke waren verblasen, bezw. mit Schliffen versehen.

2. *Das Temperaturbad.* Zur Verwendung gelangte ein Thermostat, der mit einem Kontaktthermometer (Juchheim) versehen und mit dem eine Temperaturregelung bis auf 0,02° C möglich war.

3. *Die Spaltapparatur.* Vgl. Abb. 7. Das Zersetzungskölbchen war auf 25 ccm geeicht und am Boden ausgewölbt, um auch bei kleinen Substanz- und Flüssigkeitsmengen ein einwandfreies Arbeiten zu gewährleisten. Auf das Kölbchen war ein einfacher Rückflußkühler aufgesetzt, der mittels Schliff zur Vorlage führte. Das Gaseinleitungsrohr trug am äußeren Ende einen Dreiwegehahn, der es ermöglichte, einerseits Gas einzuleiten, andererseits aus einer angeschmolzenen Bürette Flüssigkeit zufließen zu lassen. Die in der Bürette enthaltene Flüssigkeit konnte ebenfalls von Stickstoff durchspült werden (geeignete Hahnstellung).

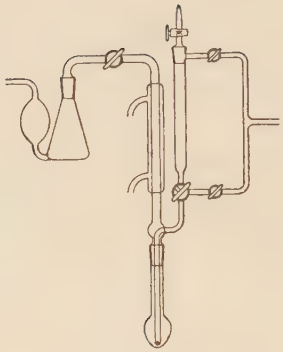


Abb. 4

4. *Die Spaltung.* Mit Ausnahme der Wollen wurden sämtliche Substanzen in das Zersetzungskölbchen direkt eingewogen. Im Falle der Wolle verfuhr man wie bei den Cystinbestimmungen. Nun versah man das Kölbchen mit Kühler und Einleitungsrohr und spülte etwa ½ Stunde mit Stickstoff durch. Nachdem die Vorlage mit 0,1-n HCl versehen war, ließ man aus der Bürette durch Umlegen des Dreiwegehahns Lauge zulaufen, die vorher durch Hindurchperlen von Stickstoff luftfrei gemacht wurde. Nach Ablauf der festgesetzten Spaltzeit wurde die Vorlage gegen eine solche mit $Cd(CH_3COO)_2$ ausgetauscht und eine hinreichende Menge Säure zulaufen lassen. Nun erhitzte man das Zersetzungskölbchen unter gleichzeitiger Durchspülung mit Stickstoff 40—50 Minuten lang auf 100° und ließ im N_2-Strom erkalten. Bei den Spaltversuchen an Wolle wurde soviel Säure zugegeben, bis die Lösung etwa 6-n war und anschließend hydrolysiert. Nach Beendigung des Durchspülens bzw. der Hydrolyse wurden Kühler und Einleitungsrohr ausgespült und der Kölbcheninhalt bis zur Marke (25 ccm) aufgefüllt.

5. *Die Bestimmung des abgespaltenen Ammoniaks* erfolgte durch Titration der vorgelegten HCl in der Siedehitze mit 0,1-n NaOH unter Verwendung des kombinierten Indikators nach Groak[48]) (Mikrobürette).

6. *Die Bestimmung des abgespaltenen Schwefelwasserstoffes* erfolgte durch Titration mit 0,1-n Jod. Nach Zugabe von 10%iger KJ-Lösung gibt man soviel KJO_3-Lösung zu, bis die braune Jodfarbe bestehen bleibt. Dann säuerte man mit HCl an und titrierte den Jodüberschuß mit 0,1-n $Na_2S_2O_3$ zurück. Bei allen Systemen erfolgte außerdem Abspaltung von elementarem Schwefel. Er wurde nicht quantitativ bestimmt.

7. *Bestimmung der SH- und SS-Werte in den Spaltansätzen.* Aus den auf 25 ccm aufgefüllten Substratlösungen wurden die Proben unbeschadet

[48]) Biochem. Ztschr. 244, 294 (1932).

etwa vorhandener Trübungen entnommen und in 25 ccm Meßkölbchen, die vorher mit CO_2 gefüllt waren, pipettiert. Erst nachdem die Farbe voll entwickelt war, d. h. nachdem die vorgeschriebene Wartezeit um war, wurde auf 25 ccm aufgefüllt und die Farblösung so lange zentrifugiert, bis sich jede Trübung abgesetzt hatte. Nun erst wurden die Lösungen vermessen. Um andere reduzierende Substanzen auszuschalten, wurden bei allen Spaltungen folgende Farbansätze gemacht.

a) Substrat + 6,5 ccm Acetatpuffer (p_H 5,2) + 2 ccm WPhS
b) Substrat + 6,5 ccm Bikarbonat (bei 20° ges.) + WPhS
c) Substrat + 6,5 ccm Acetat + 2 ccm 0,2 m $HgCl_2$ + WPhS
d) Substrat + 6,5 ccm Bikarbonat + 2 ccm 0,2 m $HgCl_2$ + WPhS
e) Substrat + 6,5 ccm Acetat + 2 ccm Na_2SO_3 (20%ig) + WPhS
f) Substrat + 6,5 ccm Acetat + 2 ccm Na_2SO_3 + 2 ccm 0,2 m $HgCl_2$ + WPhS
g) Substrat + Acetat
h) Acetat + WPhS + Sulfit
i) Acetat + WPhS.

Alle Farbwerte (a—i) werden als Extinktionskoeffizienten berechnet.

Berechnung des wahren SH-Wertes. In dem Pseudo-SH-Wert a bzw. b sind enthalten:

1. Der Farbwert, den andere reduzierende Substanzen hervorbringen können.
2. Der Farbwert des Farbansatzes g.
3. Der Farbwert des WPhS-Reagenses i.
4. Der Küvettenblindwert.

Um den Farbwert 1 zu ermitteln, wird die reduzierende Wirkung der SH-Gruppen durch Zusatz von $HgCl_2$ ausgeschaltet. In dem nun gemessenen Farbwert sind zwangsläufig die Farbwerte 2, 3, 4 enthalten. Man erhält also den wahren SH-Wert, indem man vom Pseudo-SH-Wert a bezw. b den Wert c bzw. d abzieht.

Berechnung des wahren SS-Wertes. In dem Pseudo-SS-Wert sind enthalten:

1. Der Farbwert anderer reduzierender Substanzen.
2. Der doppelte wahre SH-Wert.
3. Der Farbwert des Farbansatzes g.
4. Der Farbwert des WPhS-Reagenses i.
5. Der Küvettenblindwert.

Um den Farbwert 1 zu ermitteln, wird ebenfalls wieder $HgCl_2$ zugesetzt. Dabei sind in den neuen Werten enthalten:

1. Der Farbwert anderer reduzierender Substanzen.
2. Der Farbwert des Farbansatzes g.
3. Der Farbwert des (Folin) WPhS-Reagenses i.
4. Der Küvettenblindwert.
5. Die durch das Sulfit hervorgerufene tiefere Blaufärbung des WPhS-Reagenses, bedingt durch den Ausfall der hemmenden Wirkung der SH-Gruppen.

Würde man also den Wert f abziehen, so wäre dieser Blindwert zu hoch, da die Reaktion 5 bei der Entwicklung der blauen Farbe im Falle e nicht abläuft. Es wird also in einem getrennten Ansatz die Reduktionswirkung des Sulfites ermittelt, Ansatz h. Nun sind aber in diesem Farbansatz die Eigenfarbe des WPhS-Reagenses und der Küvettenblindwert enthalten. Der wirkliche Sulfitwert ergibt sich also aus der Differenz zwischen Ansatz h und i, so daß sich der wahre Blindwert bEk folgendermaßen errechnet:

$$bEk = bEkf - (bEkh - bEki)$$

Der wahre SS-Wert ergibt sich dann auf folgende Weise:
Wahrer SS-Wert Ekb = Ekbe — (2. wahrer SH-Wert — bEk) also mit den oben stehenden Bezeichnungen:

$$\text{SS-Wert} = e - (2.\ (b - d) + f - (h - i))$$
$$= e - (2.\ (b - d) + f - h + i)$$

Der Absolutwert der Substratfarbe ist also nicht nötig. Der Ausdruck 2. (b—d) gilt nur, wenn für SH- und SS-Bestimmung gleiche Substrat mengen verwendet wurden. Im anderen Falle ist dieser Wert der Eichkurve zu entnehmen, unter Zugrundelegung des wahren SH-Wertes. Als richtiger SH-Wert wird der in Bikarbonat gemessene Wert benutzt, auch im Vergleich zu dem in Acetat gemessenen SS-Wert.

a) Spaltung von Cystin.

t = 60° C Zeit = 90 Minuten n-NaOH
Einwaage: 34,7 mg. Maximale H_2S-Ausbeute: 9,69 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 4,91 mg. Jodverbr. 0,0 ccm. HCl-Verbr. 0,0 ccm.

2 ccm Substrat	1 ccm Substrat	
b = 0,536	e = 2,200	h = 0,220
d = 0,280	f = 0,230	i = 0,130

SH-Wert: 0,535 — 0,280 = 0,255 = 0,200 mg.
Gesamt SH: 2,5 mg = *7,2% d. Th.*
SS-Wert: 2,200 — (0,358 — 0,220 + 0,230 + 0,130) = 1,675 = 1,180 mg.
Gesamt SS: 29,55 mg = *85,3% d. Cystins.*

t = 60° C Zeit 90 Minuten n-NaOH
Einwaage: 23,1 mg. Maximale H_2S-Ausbeute: 6,45 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 3,37 mg. Jodverbrauch: 0,0 ccm. HCl-Verbr.: 0,0 ccm.

2 ccm Substrat	1 ccm Substrat	
b = 0,405	e = 1,560	h = 0,220
d = 0,220	f = 0,180	i = 0,130

SH-Wert: 0,405 — 0,220 = 0,185 = 0,145 mg.
Gesamt SH: 1,81 mg = *7,85% d. Th.*
SS-Wert: 1,560 — (0,215 + 0,180 — 0,220 + 0,130) = 1,560 — 0,305 = 1,255.
Gesamt SS 22,3 mg = *92,5% d. Cystins.*

t = 60° C Zeit = 8 Std. 15 Min. n-NaOH

Einwaage: 55,0 mg. Maximale H_2S-Ausbeute: 15,6 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 7,79 mg. Jodverbrauch: 0,04 ccm = 0,068 mg H_2S = 0,04% d. Th. HCl-Verbrauch: 0,24 ccm = 0,347 mg NH_3 = 4,34%.

2 ccm Substrat	1 ccm Substrat auf 25 dav. 10 ccm	
b = 1,650	e = 1,400	h = 0,115
d = 0,240	f = 0,230	i = 0,050

SH-Wert: 1,650 — 0,240 = 1,410 = 1,005 mg.
Gesamt SH: 12,55 = 22,8% d. Th.
SS-Wert: 1,400 — (0,740 + 0,100) = 0,560 = 0,424 mg.
Gesamt SS: 26,5 mg = 48,1% d. Cystins.

t = 60° C Zeit = 8 Std. 15 Min. n-NaOH

Einwaage: 72,4 mg. Maximale H_2S-Ausbeute: 20,5 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 10,25 mg. Jodverbrauch: 0,06 ccm = 0,102 mg H_2S = 0,05% d. Th. HCl-Verbrauch: 0,25 ccm = 0,426 mg NH_3 = 4,15% d. Th.

2 ccm Substrat	1 ccm Substrat auf 25 dav. 10 ccm	
b = 2,180	e = 1,600	h = 0,115
d = 0,250	f = 0,280	i = 0,050

SH-Wert: 2,18 — 0,250 = 1,930 = 1,370 mg.
Gesamt SH: 17,1 mg = *23,6% d. Th.*
SS-Wert: 1,600 — (0,825 + 0,100) = 0,775 = 0,570 mg.
Gesamt SS: 35,6 mg = *49,2% d. Cystins.*

Spaltung von Dialanylcystin.

t = 80° C Zeit 15 Minuten n-NaOH

Einwaage: 67,1 mg = 42,2 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 11,95 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 5,96 mg. Jodverbrauch: 0,32 ccm = 0,545 mg = 3,66%.

2 ccm Substrat	1 ccm Substrat
b = 1,200	e = 2,280
d = 0,180	f = 0,220

SH-Wert: 1,200 — 0,180 = 1,020 = 0,744 mg.
Gesamt SH: 9,19 mg = *21,8% d. Th.*
SS-Wert: 2,280 — (1,095 + 0,160) = 1,185 = 0,846 mg.
Gesamt SS 21,2 mg = *50,2% d. Cystins.*

t = 80° C Zeit 15 Minuten n-NaOH

Einwaage: 60,4 mg = 37,9 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 10,72 mg. Jod: 0,23 ccm = 0,392 mg H_2S = 4,56% d. Th.

2 ccm Substrat	1 ccm Substrat
b = 1,100	e = 2,170
d = 0,180	f = 0,240

SH-Wert: 1,100 — 0,180 = 0,635 mg.
Gesamt SH: 7,95 = *21,0% d. Th.*
SS-Wert: 2,170 — (0,935 + 0,100) = 1,135 = 0,815 mg.
Gesamt SS: 20,2 mg = *53,7% d. Cystins.*

Spaltung von Dikarbo-benzoxy-cystinyl-diglycin.

t = 40° C Zeit 15 Minuten n-NaOH
Einwaage: 97,4 mg = 37,5 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 10,62. Jodverbrauch: 0,86 ccm = 1,465 mg H_2S = 13,8% d. Th.

2 ccm Substrat	1 ccm Substrat	
b = 1,220	e = 1,260	h = 0,220
d = 0,180	f = 0,200	i = 0,130

SH-Wert: 1,220 — 0,180 = 1,040 = 0,744 mg.
Gesamt SH: 9,3 mg = *24,8% d. Th.*
SS-Wert: 1,260 — (1,095 — 0,220 + 0,200 + 0,130) = 1,260 — 1,205 = 0,055.
Gesamt SS: 0.

t = 40° C Zeit 15 Minuten n-NaOH
Einwaage: 79,4 mg = 30,6 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 8,68 mg. Jodverbrauch: 0,76 ccm = 1,295 mg H_2S = 14,9% d. Th.

2 ccm Substrat	1 ccm Substrat	
b = 1,020	e = 1,060	h = 0,220
d = 0,150	f = 0,200	i = 0,130

SH-Wert: 1,020 — 0,150 = 0,870 = 0,630 mg.
Gesamt SH: 7,87 mg = *25,7% d. Th.*
SS-Wert: 1,060 — (0,930 — 0,220 + 0,200 + 0,130) = 1,060 — 1,040 = 0,020.
Gesamt SS: 0.

Temperaturabhängigkeit der SS-Glutathionspaltung[49]).

t = 30° C Zeit 2 Stunden n-NaOH
Einwaage: 36,2 mg = 14,4 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 4,08 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 2,04 mg. Jodverbrauch: 0,05 ccm = 0,084 mg H_2S = 2,05% d. Th. HCl-Verbrauch: 0 ccm.

3 ccm Substrat	1 ccm Substrat	
b = 1,468	e = 1,226	h = 0,250
d = 0,202	f = 0,378	i = 0,118

SH-Wert: 1,468 — 0,202 = 1,266 = 0,89 mg.
Gesamt SH: 7,43 mg = *51,6% d. Th.*
SS-Wert: 1,226 — (0,880 + 0,378 + 0,118 — 0,250) = 0,100 = 0,0 mg.
Gesamt SS: 0,0.

t = 40° C Zeit 2 Stunden n-NaHO
Einwaage: 51,1 mg = 20,0 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 5,67 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 2,83 mg. Jodverbrauch: 0,18 ccm = 0,38 mg H_2S = 6,7% d. Th. HCl-Verbrauch: 0,04 ccm = 0,068 mg NH_3 = 0,24% d. Th.

---

[49]) Präparat der Fa. Hoffmann-La Roche in Berlin.

2 ccm Substrat 1 ccm Substrat

b = 1,376 e = 1,354 h = 0,250

d = 0,180 f = 0,282 i = 0,118

SH-Wert: 1,376 — 0,180 = 1,180 = 0,854 mg.

Gesamt SH: 10,66 mg = *53,3% d. Th.*

SS-Wert: 1,354 — (1,260 + 0,282 + 0,118 — 0,250) = 0,056 = 0 mg.

Gesamt SS: 0.

t = 50° C Zeit 2 Stunden n-NaOH

Einwaage: 72,5 mg = 28,5 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 8,05 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 3,79 mg. Jodverbrauch: 0,38 ccm = 0,647 mg H_2S = 8,05% d. Th. HCl-Verbr.: 0,27 ccm = 0,360 mg NH_3 = 0,95%.

2 ccm Substrat 2 ccm Substrat 1 ccm Substrat

a = 1,016 b = 1,660 e = 1,726 h = 0,150

c = 0,180 d = 0,180 f = 0,198 i = 0,118

SH-Wert (Acetat): 1,016 — 0,180 = 0,836 = 0,606 mg.

Gesamt SH: 7,56 mg = *26,7% d. Th.*

SH-Wert (Bikarbonat): 1,660 — 0,180 = 1,480 = 1,052 mg.

Gesamt SH: 13,2 mg = *46,3% d. Th.*

Gesamt SS: 1,726 — (1,550 + 0,198 + 0,118 — 0,150) = 0,01.

Gesamt SS: 0.

t = 50° C Zeit 2 Stunden n-NaOH

Einwaage: 136,0 mg = 53,4 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 15,1 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 7,12 mg. Jodverbrauch: 0,66 ccm = 1,12 mg H_2S = 7,43% d. Th. HCl.-Verbrauch: 0,32 ccm = 0,545 mg NH_3 = 7,66% d. Th.

1 ccm Substrat 1 ccm Substrat 0,5 ccm Substrat

a = 0,587 b = 1,400 e = 1,546 h = 0,150

c = 0,096 d = 0,142 f = 0,210 i = 0,118

SH-Wert (Acetat): 0,587 — 0,096 = 0,491 = 0,363 mg.

Gesamt SH: 9,10 mg = *17,1% d. Th.*

SH-Wert (Bikarbonat): 1,400 — 0,142 = 1,258 = 0,896 mg.

Gesamt SH: 22,4 mg = *42,0% d. Th.*

SS-Wert: 1,546 — (1,320 + 0,210 + 1,118 — 0,150) = 0,048.

Gesamt SS: 0.

t = 60° C Zeit 2 Stunden n-NaOH

Einwaage: 83,6 mg = 32,8 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 9,3 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 4,65 mg. Jodverbrauch: 0,92 ccm = 1,57 mg H_2S = 16,9% d. Th. HCl-Verbrauch: 0,37 ccm = 1,24 mg NH_3 = 26,8% d. Th.

2 ccm Substrat 1 ccm Substrat

b = 1,742 e = 1,832 h = 0,150

d = 0,360 f = 0,318 i = 0,118

SH-Wert: 1,742 — 0,360 = 1,382 = 0,988 mg.

Gesamt SH: 12,3 mg = *37,6% d. Th.*

SS-Wert: 1,832 — (1,450 + 0,318 — 0,150 + 0,118) = 0,096.

Gesamt SS: 0.

t = 70° C Zeit 2 Stunden n-NaOH
Einwaage: 61,3 mg = 24,0 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 6,80 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 3,40 mg. Jodverbrauch: 0,87 ccm = 1,48 mg H_2S = 21,8% d. Th. HCl-Verbrauch: 0,75 ccm = 1,27 mg NH_3 = 37,4% d. Th.

3 ccm Substrat	2 ccm Substrat	
b = 1,084	e = 1,164	h = 0,250
d = 0,152	f = 0,102	i = 0,118

SH-Wert: 1,084 — 0,152 = 0,932 = 0,673 mg.
Gesamt SH: 5,6 mg = *23,3% d. Th.*
SS-Wert: 1,164 — (1,320 + 0,102 — 0,250 + 0,118) = —0,126.
Gesamt SS: 0.

t = 80° C Zeit 2 Stunden n-NaOH
Einwaage: 56,4 mg = 22,1 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 6,25 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 3,13 mg. Jodverbrauch: 1,20 ccm = 2,05 mg H_2S = 32,8% d. Th. HCl-Verbrauch: 1,02 ccm = 1,735 mg NH_3 = 55,5% d. Th.

2 ccm Substrat	1 ccm Substrat	
b = 0,443	e = 0,418	h = 0,150
d = 0,124	f = 0,100	i = 0,118

SH-Wert: 0,443 — 0,124 = 0,319 = 0,242 mg.
Gesamt SH: 3,03 mg = *13,7% d. Th.*
SS-Wert: 0,418 — (0,360 + 0,100 — 0,150 + 0,118) = 0,01.
Gesamt SS: 0.

t = 90° C Zeit 2 Stunden n-NaOH
Einwaage: 91,3 mg = 35,8 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 10,15 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 5,06 mg. Jodverbrauch: 2,76 ccm = 4,71 mg H_2S = 46,4% d. Th. HCl-Verbrauch: 2,09 ccm = 3,56 mg NH_3 = 70,5% d. Th.

2 ccm Substrat	2 ccm Substrat	
b = 0,301	e = 0,669	h = 0,250
d = 0,124	f = 0,195	i = 0,118

SH-Wert: 0,301 — 0,124 = 0,177 = 0,139 mg.
Gesamt SH: 1,74 mg = *4,99% d. Th.*
SS-Wert: 0,669 — (0,415 + 0,195 — 0,150 + 0,118) = 0,091.
Gesamt SS: 0.

t = 98° C Zeit 2 Stunden n-NaOH
Einwaage: 75,6 mg = 29,0 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 8,40 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 3,96 mg. Jodverbrauch: 2,68 ccm = 4,57 mg H_2S = 54,5% d. Th. HCl-Verbrauch: 1,83 ccm = 3,12 mg NH_3 = 78,8% d. Th.
SH-Wert: 0. SS-Wert: 0.

Temperaturabhängigkeit des SH-Glutathions.

t = 80° C Zeit 2 Stunden n-NaOH
Einwaage: 62,5 mg = 24,6 mg Cystein. Maximale H_2S-Ausbeute:

6,91 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 3,46 mg. Jodverbrauch: 0,5 ccm = 0,852 mg H_2S = 12,3% d. Th. HCl-Verbrauch: 0,0 ccm. Gesamt SH: 21,3 mg = 86,5%.

t = 90° C Zeit 2 Stunden n-NaOH
Einwaage: 36,9 mg = 14,5 mg Cystein. Maximale H_2S-Ausbeute: 4,07 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 2,02 mg. HCl-Verbrauch: 0,0 ccm. Jodverbrauch: 0,47 ccm = 0,800 mg H_2S = 19,7% d. Th. Gesamt SH: 11,6 mg = 79,9%.

Spaltung von Cystinhydantoin. Qualitative Vorprobe: Lösen in n-NaOH, kurze Zeit bei 40° C stehen lassen, ansäuern, H_2S wegkochen, in Eis kühlen, filtrieren und mit Nitroprussidnatrium auf SH prüfen. Probe possitiv. Ebenso spricht WPhS-Reagens in Bikarbonatlösung an.

t = 40° C Zeit 2 Stunden n-NaOH
Einwaage: 40,2 mg = 33,5 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 9,5 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 4,6 mg. Jodverbrauch: 2,37 ccm = 4,04 mg = 42,5% d. Th. HCl-Verbrauch: 0. SH-Wert: 0. SS-Wert: 0.

t = 40° C Zeit 15 Minuten 0,1-n NaOH
Einwaage: 27,5 mg entspricht: 22,6 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 6,4 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 3,2 mg. Jodverbrauch: 0,19 ccm = 0,32 mg H_2S = 5,06%. HCl-Verbrauch: 0. *SH-Wert: 42,5% d. Th.* SS-Wert: 0.

t = 40° C Zeit 15 Minuten 0,1-n NaOH
Einwaage: 26,1 mg = 21,75 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 6,18 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 3,08 mg. Jodverbrauch: 0,2 ccm = 0,37 mg H_2S = 5,56% d. Th. HCl-Verbrauch: 0. *SH-Wert: 45,0%.* SS-Wert: 0.

t = 40° C Zeit 15 Minuten 0,1-n NaOH
Einwaage: 31,6 mg = 26,35 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 7,47 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 3,73 mg. Jodverbrauch 0,14 ccm = 0,24 mg H_2S = 3,19% d. Th. HCl-Verbrauch: 0 ccm. *SH-Wert: 47,7%.* SS-Wert: 0.
Mittelwert: t = 40° C Zeit 15 Minuten 0,1-n NaOH
H_2S: 4,6% NH_3: 0,0% SH: 45,1% SS: 0%.

t = 60° C Zeit 15 Minuten 0,1-n NaOH
Einwaage: 48,9 mg = 40,75 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 11,54 mg. Jodverbrauch: 0,78 ccm = 1,33 mg = 11,5% H_2S d. Th.

2 ccm Substrat	1 ccm Substrat	
b = 1,340	e = 0,480	h = 0,220
d = 0,170	f = 0,110	i = 0,130

SH-Wert: 1,340 — 0,170 = 1,170 = 0,836 mg.
Gesamt SH: 10,45 mg = *25,6% d. Th.*
SS-Wert: 0,480 — (0,570 + 0,110 + 0,130 — 0,220) = 0,480 — 0,580 = — 0,100.
Gesamt SS: 0.

$t = 60^0$ C Zeit 15 Minuten 0,1-n Na OH
Einwaage: 54,0 mg = 45,0 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 12,74 mg. Jodverbrauch: 0,83 ccm = 1,41 mg = 11,1% H_2S.

2 ccm Substrat	1 ccm Substrat	
b = 1,510	e = 0,330	h = 0,220
d = 0,170	f = 0,110	i = 0,130

SH-Wert: 1,510 — 0,170 = 1,340 = 0,956 mg.
Gesamt SH: 11,93 mg = *26,5% d. Th.*
SS-Wert: 0,330 — (0,660 + 0,100 + 0,130 — 0,220) = 0,330 — 0,670 = — 0,20.
Gesamt SS: 0.

Darstellung des Dialanyl-Cystin-Dianhydrid. Bis auf einige kleine Abänderungen wurde die von *Bergmann* und Stather[50]) angegebene Synthese beibehalten. Als Ausgangsmaterial dienten l-Cystin und α-Brompropionylbromid, die nach E. Fischer und U. Suzuki[51]) in alkalischer Lösung gekuppelt wurden. Dabei erwies es sich zweckmäßig, die Reaktionslösungen auf —4° C abzukühlen und das Brompropionylbromid nicht zu langsam zuzugeben. Das Reaktionsgemisch ließ man dann über Nacht auf Zimmertemperatur kommen. Das α-ständige Br-Atom des so dargestellten Dibrompropionyl-cystins wurde dann im Autoklaven bei 40° C in gesättigter wässeriger NH_3-Lösung gegen die NH_2-Gruppe ausgetauscht. Die Herstellung des Dialanyl-cystin-diäthylesters erfolgte durch Einleiten von trockenem HCl-Gas in eine Suspension von Dialanylcystin in absolutem Äthylalkohol, wobei das Peptid in Lösung ging. Dabei wurde mit Eis gekühlt und gerührt. Die Temperatur überstieg 5° C nicht. Nach mehrmaligem Verdampfen des Alkohols und Wiederholen der Veresterung wurde der zu einem zähen Syrup eingedickte Ester bei 0° in Methanol gelöst, das bei 0° mit Ammoniak gesättigt war. Aus der klaren, leicht braun gefärbten Lösung schied sich das Dialanyl-cystin-dianhydrid in kleinen Kristallen langsam ab. Die Ausbeute war etwas höher als die von *Bergmann* und *Stather* angegebene. Das Diketopiperazin ließ sich aus viel Wasser, dem einige Tropfen Eisessig zugesetzt waren umkristallisieren. Cystin ber. 69,4%, gef. 69,1%.

Beobachtungen bei der Spaltung von Dialanyl-Cystin-dianhydrid. Verwendung von 0,1-n NaOH. Bei 40° trat nach 15 Minuten keine klare Lösung ein. Die Lösung war, solange sie alkalisch war, schwach gelb gefärbt. Nach dem Ansäuern mit 1 ccm 12-n H_2SO_4 wurde die Lösung milchig trübe. Erhitzt man darauf die Lösung 30 Minuten bei 120° Badtemperatur in der Absicht, den Schwefelwasserstoff restlos zu entfernen, so ballte sich die Trübung zu Flocken zusammen, die Schwefel darstellten. Der Geruch der Lösung erinnerte an cyklisch gebaute Merkaptane. Seine Intensität nimmt bei erhöhter Spalttemperatur ab. Bei 60° waren die Be-

[50]) H. 152, 189 (1926).
[51]) B. 37, 4575 (1904).

obachtunngen die gleichen. Bei 80° nahm die Menge der abgeschiedenen Flocken zu.

Verwendung von n-NaOH. Bei 40° trat bereits nach 5 Minuten vollständige Lösung ein. Die gelb gefärbte Lösung schied beim Zersetzen mit 2 ccm 12-n H_2SO_4 gelbe Flocken ab, die schon der Menge nach zu urteilen nicht ausschließlich aus Schwefel bestehen konnten. Unzersetztes Diketopiperazin konnte es nicht sein, wie die Analyse des ganzen Ansatzes zeigte. Auffällig war, daß sich die Menge mit zunehmender Spalttemperatur nicht wesentlich erhöhte. Weiter fiel auf, daß neben der SH-Verbindung noch andere Substanzen zugegen waren, die WPhS-Reagens aber nur in Bikarbonatlösung reduzierten.

Spaltung von Dialanyl-cystin-dianhydrid.

t = 40° C Zeit 15 Minuten 0,1-n NaOH

Einwaage: 26,5 mg = 18,35 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 5,20 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 2,60 mg. Jodverbrauch: 0,52 ccm = 0,545 mg H_2S = 10,45% d. Th. HCl-Verbrauch: 0,19 ccm = 0,32 mg NH_3 = 12,5% d. Th.

2 ccm Substrat	1 ccm Substrat	
b = 0,586	e = 0,940	h = 0,268
d = 0,093	f = 0,246	i = 0,104

SH-Wert: 0,586 — 0,093 = 0,395 mg.
Gesamt SH: 4,54 mg = *24,7% d. Th.*
SS-Wert: 0,940 — (0,540 + 0,246 — 0,268 + 0,104) = 0,318 = 0,252 mg.
Gesamt SS: 6,3 mg = *34,4% d. Th.*

t = 40° C Zeit 15 Minuten 0,1-n NaOH

Einwaage: 28,0 mg = 19,4 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 5,5 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 2,75 mg. Jodverbrauch 0,32 ccm = 0,55 mg H_2S = 9,9% d. Th. HCl-Verbrauch: 0,09 ccm = 0,15 mg NH_3 = 5,6% d. Th.

2 ccm Substrat	1 ccm Substrat	
b = 0,689	e = 0,886	h = 0,268
d = 0,196	f = 0,232	i = 0,104

SH-Wert: 0,689 — 0,196 = 0,493 = 0,364 mg.
Gesamt SH: 4,55 mg = *23,4% d. Th.*
SS-Wert: 0,886 — (0,525 + 0,232 — 0,268 + 0,104) = 0,886 — 0,593 = 0,293 = 0,234 mg.
Gesamt SS: 5,85 mg = *30,1% des Cystins.*

t = 60° C Zeit 15 Minuten 0,1-n NaOH

Einwaage: 25,7 mg = 17,8 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 5,05 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 2,52 mg. Jodverbrauch: 0,77 ccm = 1,31 mg H_2S = 26,0% d. Th.

2 ccm Substrat	1 ccm Substrat	
b = 0,522	e = 0,508	h = 0,268
d = 0,508	f = 0,178	i = 0,104

SH-Wert: 0,522 — 0,158 = 0,364 = 0,272 mg.
Gesamt SH: 3,4 mg = *19,1% d. Th.*
SS-Wert: 0,508 — (0,405 + 0,178 — 0,268 + 0,104) = 0,089.
Gesamt SS: 0.

t = 60° C Zeit 15 Minuten 0,1-n NaOH
Einwaage: 25,0 mg = 17,3 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 4,9 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 2,77 mg. Jodverbrauch: 0,73 ccm = 1,25 mg H_2S = *25,4% d. Th.*

2 ccm Substrat	2 ccm Substrat	
b = 0,429	e = 0,478	h = 0,220
d = 0,096	f = 0,200	i = 0,130

SH-Wert: 0,429 — 0,096 = 0,333 = 0,248 mg.
Gesamt SH: 3,1 mg = *17,9% d. Th.*
SS-Wert: 0,478 — (0,365 + 0,200 + 0,130 — 0,220) = 0,008.
Gesamt SS: 0.

t = 80° C Zeit 15 Minuten 0,1-n NaOH
Einwaage: 34,7 mg = 24,0 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 6,8 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 3,85 mg. Jodverbrauch: 1,57 ccm = 2,67 mg H_2S = *39,4% d. Th.*

2 ccm Substrat	1 ccm Substrat	
b = 0,343	e = 0,240	h = 0,220
d = 0,130	f = 0,150	i = 0,130

SH-Wert: 0,343 — 0,130 = 0,213 = 0,169 mg.
Gesamt SH: 2,12 mg = *8,8% d. Th.*
SS-Wert: 0,240 — (0,250 — 0,220 + 0,150 +, 0,130) = 0,070.
Gesamt SS: 0.

t = 80° C Zeit 15 Minuten 0,1-n NaOH
Einwaage: 41,9 mg = 28,9 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 4,19 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 4,27 mg. Jodverbrauch: 2,18 ccm = 3,71 mg H_2S = *45,4% d. Th.*

2 ccm Substrat	1 ccm Substrat	
b = 0,290	e = 0,240	h = 0,220
d = 0,082	f = 0,150	i = 0,130

SH-Wert: 0,249 — 0,082 = 0,167 = 0,133 mg.
Gesamt SH: 1,67 mg = *5,77% d. Th.*
SS-Wert: 0,240 — (0,200 — 0,220 + 0,150 + 0,130) = 0,020.
Gesamt SS: 0.

t = 40° C Zeit 15 Minuten n-NaOH
Einwaage: 49,2 mg = 34,1 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 9,65 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 4,82 mg. Jodverbrauch: 1,29 ccm = 2,2 mg H_2S = *22,8% d. Th.* HCl-Verbrauch: 0,27 ccm = 0,46 mg NH_3 = 9,56% d. Th.

2 ccm Substrat	1 ccm Substrat	
b = 1,110	e = 0,984	h = 0,268
d = 0,290	f = 0,242	l = 0,104

SH-Wert: 1,110 — 0,290 = 0,820 = 0,594 mg.
Gesamt SH: 7,41 mg = *21,7% d. Th.*
SS-Wert: 0,984 — (0,880 + 0,242 — 0,268 + 0,104) = 0,984 — 0,985 = 0,001.
Gesamt SS: 0.

t = 40° C Zeit 15 Minuten n-NaOH

Einwaage: 40,5 mg = 28,0 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 7,94 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 3,96 mg. Jodverbrauch: 0,93 ccm = 1,59 mg H_2S = *20,0% d. Th.* HCl-Verbrauch: 0,14 ccm = 0,238 mg NH_3 = 6,02% d. Th.

2 ccm Substrat	1 ccm Substrat	
b = 0,968	e = 0,816	h = 0,268
d = 0,308	f = 0,220	i = 0,104

SH-Wert: 0,968 — 0,308 = 0,660 = 0,485 mg.
Gesamt SH: 6,05 mg = *21,8% d. Th.*
SS-Wert: 0,816 — (0,715 + 0,220 — 0,268 + 0,104) = 0,816 — 0,791 = 0,025.
Gesamt SS: 0.

t = 60° C Zeit 15 Minuten n-NaOH

Einwaage: 41,0 mg = 28,4 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 8,05 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 4,04 mg. Jodverbrauch: 1,10 ccm = 1,87 mg H_2S = *23,2% d. Th.*

2 ccm Substrat	1 ccm Substrat	
b = 1,180	e = 0,756	h = 0,220
d = 0,400	f = 0,240	i = 0,130

SH-Wert: 1,180 — 0,400 = 0,780 = 0,565 mg.
Gesamt SH: 7,06 mg = *24,8% d. Th.*
SS-Wert: 0,756 — (0,835 + 0,240 — 0,220 + 0,130) = — 0,207.
Gesamt SS: 0.

t = 60° C Zeit 15 Minuten n-NaOH

Einwaage: 42,9 mg = 29,7 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 8,42 mg. Jodverbrauch: 1,07 ccm = 1,825 mg H_2S = *21,7% d. Th.*

2 ccm Substrat	1 ccm Substrat	
b = 1,310	e = 0,696	h = 0,260
d = 0,522	f = 0,262	i = 0,104

SH-Wert: 1,310 — 0,522 = 0,788 = 0,570 mg.
Gesamt SH: 7,11 mg = *25,0% d. Th.*
SS-Wert: 0,696 — (0,942 + 0,262 — 0,268 + 0,104) = — 0,246.
Gesamt SS: 0.

4. EINWIRKUNG VON ALKALIEN AUF INSULIN UND METAKERATIN.

Spaltung von Insulin[52])[53]). 50 mg kristallisiertes Insulin — Bayer — (1 mg = 22,5 i. Ein.) wurden in 10 ccm 0,01 n-HCl gelöst. Davon wurden zu den Spaltansätzen jeweils 2 ccm entnommen. Die Cystinbestimmung führte man mit 1 ccm Insulinlösung aus. Die Spaltung wurde durch Zugabe von HCl unterbrochen und der Ansatz darauf 4 Stunden hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde im Vacuum zur Trockene eingeengt und die Cystin bzw. Cysteinbestimmung in Bikarbonatlösung ausgeführt.

Spaltansatz 1. 2 ccm Substratlösung, 2 ccm 1n-NaOH, 15 Minuten bei 40° C spalten, 4 ccm c. HCl zugeben, 4 Std. bei 120° hydrolysieren.
SH-Bestimmung: Ek = 0,560 bEk = 0,060 Ekb = 0,500
Cystein: 0,369 mg = *36% d. Th.*
SS-Bestimmung: Ek = 1,100 bEk = 0,100 Ekb = 1,000
= Verdoppelung des SH-Wertes, also SS = 0.
H_2S: Jodverbrauch: 0,23 (0,26) ccm 0,01-n Jodlösung = 0,039 mg (0,044 mg) H_2S = *14,3% d. Th.*

Spaltansatz 2. Ansatz wie oben.
SH-Bestimmung: Ek = 0,575 bEk = 0,060 Ekb = 0,515
Cystein: 0,378 mg = *36,8% d. Th.*
SS-Bestimmung: Ek = 1,135 bEk = 0,100 Ekb = 1,035
= Verdoppelung des SH-Wertes, also SS = 0.
H_2S: Jodverbrauch: 0,29 (0,200) ccm 0,01-n Jodlösung = 0,0426 mg H_2S im Mittel = *14,6% d. Th.*

Cystinbestimmung: Das Hydrolysat wird zur Trockene eingeengt, mit Wasser aufgenommen und die Bestimmung in Bikarbonatlösung ausgeführt. Ek = 0,750 bEk = 0,060 Ekb = 0,690 in einem ccm, also 0,513 mg Cystin. Cystingehalt des Insulins also 10,26%.

Die Darstellung des Metakeratins erfolgte nach den Angaben von L. Michaelis[9]). Dabei zeigte sich jedoch, daß das Lösen des Keratins nicht so schnell eintrat, wie Michaelis angab. Selbst nach 3 Tagen war noch ein beträchtlicher Teil ungelöst. Diese Erfahrungen decken sich mit den von anderen Bearbeitern gemachten. Cystingehalt der Ausgangswolle: 10,95%; Cystingehalt des daraus gewonnenen Metakeratins: 10,8%.

Spaltung von Metakeratin. t = 100° C, Zeit 1 Stunde, 0,5-n NaOH. Einwaage: 170,3 mg = 18,5 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 5,25 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 2,62 mg. Jodverbrauch: 1,34 ccm = 2,28 mg = *43,5% H_2S d. Th.* HCl-Verbrauch: 0,73 ccm = 1,24 mg = 47,4% NH_3 d. Th. SH-Wert: 1,33 mg = *7,19% d. Th.* SS-Wert: 0.
t = 50° C Zeit 2 Stunden 0,5-n NaOH
Einwaage: 176,2 mg = 19,2 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute:

---

[52]) Präparat der I. G. Farbenindustrie A.G. Frankfurt/Main—Höchst, das mir in freundlicher Weise überlassen wurde.

[53]) Versuchsanordnung wie bei Spaltung der Cystinderivate (Abschn. 3).

5,44 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 2,72 mg. Jodverbrauch: 1,07 ccm = 1,82 mg H_2S = *33,5% d. Th.* HCl-Verbrauch: 0,27 ccm = 0,46 mg NH_3 = 16,9% d. Th. SH-Wert: 1,484 mg = *7,74% d. Th.* SS-Wert: 2,168 mg = *11,3% d. Cystins.*

5. ANGREIFBARKEIT DES WOLLEKERATINS DURCH ALKALI UND WASSER.

a) Einwirkung von NaOH[54]). Wolle 11 b.

t = 50° C Zeit 30 Minuten n-NaOH
Einwaage: 449,0 mg = 53,1 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 15,04 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 7,54 mg. H_2S gefunden: 13,8%. NH_3 gefunden: Spuren.

3 ccm Substrat	0,5 ccm Substrat	
b = 0,908	e = 0,621	h = 0,156
d = 0,300	f = 0,177	i = 0,016

SH-Wert: 0,908 — 0,300 = 0,608 = 0,441 mg.
Gesamt SH: 3,68 mg = *6,94% d. Th.*
SS-Wert: 0,621 — (0,190 + 0,177 — 0,158 + 0,061) = 0,351 = 0,282 mg.
Gesamt SS: 14,1 mg = *26,5% d. Cystins.*

t = 50° C Zeit 2 Stunden n-NaOH
Einwaage: 423,0 mg = 46,0 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 13,02 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 6,52 mg. H_2S gefunden: 18,3% d. Th. NH_3 gefunden: 17,8% d. Th.

3 ccm Substrat	0,5 ccm Substrat	
b = 0,906	e = 0,606	h = 0,158
d = 0,289	f = 0,212	i = 0,061

SH-Wert: 0,906 — 0,289 = 0,617 = 0,448 mg.
Gesamt SH: 3,73 mg = *8,1% d. Th.*
SS-Wert: 0,606 — (0,230 + 0,212 + 0,061 — 0,158) = 0,261 = 0,204 mg.
Gesamt SS: 10,2 mg = *22,2% d. Cystins.*

t = 50° C Zeit 5 Stunden n-NaOH
Einwaage: 492,1 mg = 53,4 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 15,1 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 7,1 mg. Jodverbrauch: 1,75 ccm = 2,98 H_2S = 19,7% d. Th. HCl-Verbrauch: 0,99 ccm = 1,69 mg NH_3 = 23,8% d. Th.

3 ccm Substrat	0,5 ccm Substrat	
b = 0,911	e = 0,699	h = 0,158
d = 0,241	f = 0,217	i = 0,061

---

[54]) Die Spaltungen erfolgten in der in Abschnitt 3 angegebenen Versuchsanordnung. Nach beendigter Einwirkung setzte man 5 ccm 12-n H_2SO_4 zu (Säurekonzentration wurde dadurch 6-n) und hydrolysierte vollständig durch (Stickstoffstrom). Im Hydrolysat der Spaltung war stets elementarer Schwefel vorhanden.

SH-Wert: 0,911 — 0,241 = 0,670 = 0,490 mg.
Gesamt SH: 4,09 mg = *7,66% d. Th.*
SS-Wert: 0,699 — (0,240 + 0,217 + 0,061 — 0,158) = 0,339 = 0,270 mg.
Gesamt SS: 13,5 mg = *25,3% d. Cystins.*
t = 50° C Zeit 5 Stunden n-NaOH
Einwaage: 504,0 mg = 54,7 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 15,5 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 7,75 mg. H_2S gefunden: 19,0% d. Th. NH_3 gefunden: 36,2% d. Th.

3 ccm Substrat	0,5 ccm Substrat	
b = 1,096	e = 0,713	h = 0,158
d = 0,322	f = 0,197	i = 0,061

SH-Wert: 1,096 — 0,322 = 0,774 = 0,562 mg.
Gesamt SH: 4,34 mg = *8,59% d. Th.*
SS-Wert: 0,712 — (0,280 + 0,197 + 0,061 + 0,158) = 0,332 = 0,270 mg.
Gesamt SS: 13,5 mg = *24,7% d. Cystins.*
t = 50° C Zeit 10 Stunden n-NaOH
Einwaage: 422,5 mg = 45,9 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 13,0 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 6,5 mg. H_2S gefunden: 18,6% d. Th. NH_3 gefunden: 82,0%.

3 ccm Substrat	1 ccm Substrat	
b = 1,173	e = 1,190	h = 0,158
d = 0,238	f = 0,340	i = 0,061

SH-Wert: 1,173 — 0,238 = 0,935 = 0,672 mg.
Gesamt SH: 5,6 mg = *12,2% d. Th.*
SS-Wert: 1,190 — (0,660 + 0,340 — 0,158 + 0,060) = 0,287 = 0,234 mg.
Gesamt SS: 5,85 mg = *12,75% d. Cystins.*
t = 30° C Zeit 2 Stunden n-NaOH
Einwaage: 567,0 mg = 61,6 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 17,5 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 8,72 mg. H_2S gefunden: 10,7% d. Th. NH_3 gefunden: 25% d. Th.

2 ccm Substrat	1 ccm Substrat	
b = 0,804	e = 2,462	h = 0,158
d = 0,243	f = 0,300	i = 0,061

SH-Wert: 0,804 — 0,243 = 0,561 = 0,412 mg.
Gesamt SH: 5,15 mg = *8,35% d. Th.*
SS-Wert: 2,462 — (0,660 + 0,300 + 0,061 — 0,158) = 1,599.
Gesamt SS: 11,25 mg = *28,2% d. Cystins.*

b) Einwirkung von Wasser auf Schafwolle.

1. *Nachweis der Bildung von SH-Gruppen.* Versuchsanordnung wie bei der Alkalieinwirkung auf Wolle. Wollsorte 11 b.
t = 120° C Zeit 24 Stunden Wasser
Einwaage: 614,7 mg = 66,8 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute:

18,90 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 9,45 mg. H_2S gefunden: *6,1% d. Th.*

2 ccm Substrat	1 ccm Substrat	
b = 0,711	e = 1,606	h = 0,234
d = 0,503	f = 0,296	i = 0,116

SH-Wert: 0,711 — 0,503 = 0,208 = 0,139 mg.
Gesamt SH: 1,74 mg = *2,61% d. Th.*
SS-Wert: 1,606 — (0,110 + 0,296 + 0,116 — 0,234) = 1,318 = 0,936 mg.
Gesamt SS: 46,9 mg = *70,2% d. Cystins.*

t = 120° C Bad Zeit 24 Stunden Wasser
Einwaage: 655,8 mg = 71,3 mg Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 20,2 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 10,1 mg. H_2S gefunden: *6,8% d. Th.*

2 ccm Substrat	0,5 ccm Substrat	
b = 0,688	e = 1,726	h = 0,234
d = 0,536	f = 0,284	i = 0,116

SH-Wert: 0,688 — 0,536 = 0,152 = 0,121 mg.
Gesamt SH: 1,52 mg = *2,13% d. Th.*
SS-Wert: 1,726 — (0,09 + 0,284 — 0,234 + 0,116) = 1,464 = 1,04 mg.
Gesamt SS: 52,0 mg = *73% d. Cystins.*

2. Schädigung von Schafwolle durch Wassereinwirkung in Abhängigkeit von der Versuchsdauer.

Wolle wurde in einem Thermostaten bei 120° C Badtemperatur mit Wasser gekocht. Das dabei abgespaltene Ammoniak und der Schwefelwasserstoff werden mit 0,1-n HCl und Cadmiumacetat aufgefangen. Zu beachten ist, daß ein Überhitzen der Wolle durch Anliegen an der Gefäßwand vermieden wurde (Rührer), ferner daß der Ausschluß jedweder Sauerstoffspuren gewährleistet wurde. Da das abgespaltene Ammoniak in dem im Kühler sich kondensierenden Wasser wieder gelöst würde, wurde der Kühler mit Wasser von 70—80° C gespeist.

Beschreibung der Apparatur. Vergl. Abb. 8. Als Reaktionsgefäß diente ein 1000 ccm Jenaer Schliffkolben, an dem ein mit 3 Schliffen versehener Aufsatz angebracht war. Durch den mittleren Ansatz wurde der Rührer mit Quecksilberdichtung eingeführt. Der Rührer war gleichzeitig als Einleitungsrohr ausgebildet, da sich bei Verwendung eines feststehenden Einleitungsrohres beim Rühren der Wolle Schwierigkeiten ergeben würden. Am zweiten Tubus war der Rückflußkühler angebracht (Schlangenkühler), an dessen oberem Ende sich die beiden hintereinandergeschalteten Vorlagen befanden. In den Kühlmantel tauchte ein Thermoregulator ein, mit dessen Hilfe über einen automatischen Ventilhahn dem vorgeheizten Kühlwasser kaltes Wasser zur Konstandhaltung der Temperatur zugemischt werden konnten. Als indifferenter Gasstrom wurde Stickstoff verwendet, der wie an anderer Stelle beschrieben, durch Zumischen von

Wasserstoff und Überleiten über glühendes Kupfer von Sauerstoffspuren gereinigt wurde. Beschickt wurde der Kolben durchschnittlich mit 10 bis 15 gr. Wolle und 500 ccm Wasser. Eine p_H-Messung nach 14 Tagen Versuchsdauer ergab ein p_H von 5,4. Als Badflüssigkeit diente Glycerin. Gearbeitet wurde in mäßig starkem Gasstrom (40 Blasen pro Minute).

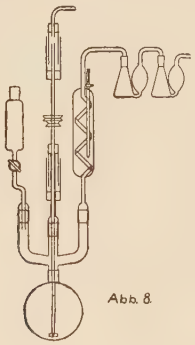


Abb. 8

Die von Natur aus schwach gelbe Wolle begann sich schon nach einem Tag zu verfärben und war nach zwei Tagen deutlich gelb. Nach 14 Tagen zeigte die Wolle braune Farbe und wurde dabei kurzfaseriger und brüchiger. Die Lösung ist gelbbraun gefärbt.

Nach Beendigung der Reaktion wurde im Gasstrom erkalten lassen, die noch nicht in Lösung gegangenen Anteile abfiltriert und gründlich mit Wasser gewaschen. Die Lösung und das Waschwasser wurden auf dem Wasserbade zur Trockene eingedampft. Die Lösung zeigte einen an Glutaminsäure erinnernden Geruch und gab mit WPhS-Reagens eine Fällung und eine schwache Blaufärbung.

Ansatz 1. Wolle 5 a. Cystingehalt: 7,75% = 0,787 gr. Maximale H_2S-Ausbeute: 0,2230 gr. Maximale NH_3-Ausbeute: 0,1115 gr.
Analyse des Wasserunlöslichen Anteiles: Cystinbestimmung nicht möglich, da die Wolle Quecksilber enthält.

Schwefelbestimmung: Einwaage 333,8 (469,7) mg. Bariumacetat 3,61 (5,04) ccm. Schwefel 6,21 (8,65) mg. Schwefel 1,86 (1,84) %.
Stickstoffbestimmung: Einwaage 168,4 (148,9) mg. Stickstoff 26,1 (20,6) mg. Stickstoff 15,5 (15,3) %.

Zeit Std.	HCl ccm	NH_3 mg	Ges. NH_3 mg	NH_3 %	Ges. NH_3 %	Jod ccm	H_2S mg	Ges. H_2S mg	H_2S %	Ges. H_2S %
24	3,40	5,79	5,79	5,19	5,19	6,78	11,55	11,55	5,18	5,18
48	3,60	6,13	11,92	5,41	10,60	7,36	12,56	24,11	5,64	10,82
72	3,00	5,11	17,03	4,59	15,19	7,34	12,50	36,61	5,61	16,43

Zeit Std.	HCl ccm	NH_3 mg	Ges. NH_3 mg	NH_3 %	Ges. NH_3 %	Jod ccm	H_2S mg	Ges. H_2S mg	H_2S %	Ges. H_2S %
97	3,90	6,64	23,66	5,86	21,05	7,80	13,30	49,91	5,96	22,39
121	2,00	3,41	27,08	3,06	24,11	7,29	12,40	62,31	5,56	27,95
145	2,40	4,09	31,17	3,66	27,77	6,30	10,73	73,04	4,82	32,77
169	1,80	3,07	34,26	2,75	30,52	6,34	10,80	83,84	4,80	37,57
217	7,00	11,92	46,16	10,70	41,22	11,69	20,30	104,14	9,11	46,68
241	2,50	4,26	50,42	3,82	45,04	5,57	9,50	113,64	4,26	50,94
289	4,47	7,62	58,04	6,84	51,88	10,17	17,60	131,24	7,90	58,84
352	5,44	9,26	67,30	8,30	60,18	10,48	17,85	149,09	8,00	66,84
409	3,70	6,31	73,61	5,66	65,84	7,62	12,95	162,04	5,81	76,65
496	4,45	7,59	81,20	6,80	72,64	4,40	7,50	169,54	3,36	80,01

Tafel 31.

Analyse des wasserlöslichen Anteiles. Cystinbestimmung: Einwaage: 62,0 mg. Cystin: 1,44 mg = 2,32%.
Schwefelbestimmung: Einwaage 1,0512 mg. Bariumacetat 5,78 ccm. Schwefel: 9,94 mg = 0,94%.

Ansatz 2. Wolle 5 b. Einwaage: 11,0990 gr. Wolle. Cystingehalt 11,1% = 1,230 gr. Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 0,348 gr. Maximale NH_3-Ausbeute: 0,174 gr.
Analyse des wasserunlöslichen Anteiles. Cystinbestimmung: Einwaage 269,6 mg (354,2 mg). Cystin: 11,9 (15,7) mg = 4,41 (4,44) %.
Schwefelbestimmung: Einwaage: 407,9 (543,8) mg. Bariumacetat: 5,15 (6,83) ccm. Schwefel: 8,86 (11,74) mg = 2,19 (2,16) %.
Stickstoffbestimmung: Einwaage: 180,4 (169,7) mg. Stickstoff: 26,8 (25,1) mg = 14,85 (14,8) %.

Zeit Std.	HCl ccm	NH_3 mg	Ges. NH_3 mg	NH_3 %	Ges. NH_3 %	Jod ccm	H_2S mg	Ges. H_2S mg	H_2S %	Ges. H_2S %
25	2,53	4,36	4,36	2,51	2,51	19,79	33,70	33,70	9,70	9,70
50	4,77	8,14	12,50	4,68	7,19	15,61	26,65	60,30	7,66	17,36
73	3,80	6,47	18,97	3,72	10,91	12,74	21,75	82,05	6,25	23,61
97	3,61	6,14	25,11	3,52	14,43	8,37	14,26	96,31	4,10	27,71
121	2,76	4,71	29,82	2,71	17,14	6,70	11,40	107,71	3,28	30,99
145	3,13	5,34	35,16	3,07	20,21	7,39	12,60	120,29	3,62	34,61
169	2,50	4,26	39,42	2,47	22,68	6,52	11,10	131,39	3,19	37,80
193	2,42	4,12	43,54	2,37	25,05	7,49	12,75	144,11	3,66	41,46
217	2,65	4,51	48,05	2,59	27,64	7,84	13,35	157,44	3,84	45,30
265	6,56	11,20	59,25	6,45	34,09	11,06	18,82	176,26	5,42	50,72
289	2,30	3,92	63,17	2,25	36,34	6,77	11,55	187,76	3,32	54,04
313	3,00	5,11	68,28	2,94	39,28	4,65	7,95	195,70	2,29	56,33
337	1,30	2,22	70,50	1,22	40,50	5,85	9,98	205,68	2,87	59,20

Tafel 32.

Analyse des wasserlöslichen Anteiles: Cystinbestimmung: Einwaage: 571,0 mg. Cystin: 14,9 mg = 2,61%.

Schwefelbestimmung: Einwaage: 511,8 mg. Bariumacetat: 3,65 ccm. Schwefel: 6,27 mg = 1,23%.

Stickstoffbestimmung: Einwaage: 155,0 (150,0) mg. Stickstoff: 24,85 (24,40) mg = 16,0 (16,2) %.

Ansatz 3. Wolle 8 a. Einwaage: 24,530 gr. Wolle. Cystingehalt: 11,8% = 2,895 gr. Maximale H_2S-Ausbeute 0,821 gr. Maximale NH_3-Ausbeute: 0,411 gr.

Analyse des wasserunlöslichen Anteiles: Cystinbestimmung: Einwaage: 618,4 (706,2) mg. Cystin: 33,2 (37,5) mg = 5,38 (5,25) %.

Schwefelbestimmung: Einwaage: 538,5 (545,4) mg. Bariumacetat: 8,48 ccm (8,86 ccm). Schwefel 15,2 (15,25) mg = 2,82 (2,80) %.

Stickstoffbestimmung: Einwaage: 174,5 (147,8) mg. Stickstoff: 29,0 (24,25) mg = 16,6 (16,45) %.

Zeit Std.	HCl ccm	NH_3 mg	Ges. NH_3 mg	NH_3 %	Ges. NH_3 %	Jod ccm	H_2S mg	Ges. H_2S mg	H_2S %	Ges. H_2S %
24	6,31	10,75	10,75	2,61	2,61	27,39	46,6	46,6	5,69	5,69
48	8,70	14,80	25,57	3,59	6,20	25,10	42,8	89,4	5,21	10,90
74	10,21	17,41	42,97	4,22	10,42	23,75	40,4	129,9	4,93	15,82
102	9,32	15,88	58,85	3,85	14,27	20,92	35,7	165,6	4,35	20,17
126	8,78	14,95	73,80	3,63	17,90	17,07	29,2	194,7	3,56	23,73
150	4,73	8,06	81,85	1,66	19,86	7,87	13,4	208,1	1,63	25,36
192	16,68	28,40	110,25	6,90	26,76	24,31	41,4	249,6	5,04	30,40
222	9,20	15,68	125,91	3,80	30,56	16,48	28,1	277,7	3,42	33,82
264	9,98	17,0	142,91	4,12	34,68	18,45	31,4	309,1	3,82	37,64
337	7,60	20,8	163,76	5,05	39,73	19,15	32,6	341,7	3,97	41,41

Tafel 33.

Analyse des wasserlöslichen Anteiles. Cystinbestimmung: Einwaage: 423,0 mg. Cystin: 9,80 mg = 2,32%.

Schwefelbestimmung: Einwaage: 407,0 mg. Bariumacetat: 3,30 ccm = 5,68 mg Schwefel = 1,40%.

Stickstoffbestimmung: Einwaage: 184,2 (213,2) mg. Stickstoff: 29,4 (33,6) mg = 15,95 (15,80) %.

Ansatz 4. Wolle 11 b. Einwaage: 11,4317 gr. Wolle. Cystingehalt: 10,87% = 1,241 gr. Maximale H_2S-Ausbeute: 0,352 gr. Maximale NH_3-Ausbeute: 0,176 gr.

Analyse des wasserunlöslichen Anteiles. Cystinbestimmung: Einwaage: 547,0 (523,8) mg. Cystin: 24,2 (25,6) mg = 4,62 (4,67) %.

Schwefelbestimmung: Einwaage: 415,1 (469,6) mg. Bariumacetat: 6,28 (6,75) ccm = 10,8 (11,6) mg. Schwefel = 2,6 (2,47) %.

Stickstoffbestimmung: Einwaage: 200,4 mg (120,8 mg). Stickstoff: 32,2 (19,2) mg = 16,05 (15,9) %.

Zeit Std.	HCl ccm	NH_3 mg	Ges. NH_3 mg	NH_3 %	Ges. NH_3 %	Jod ccm	H_2S mg	Ges. H_2S mg	H_2S %	Ges. H_2S %
24	8,18	13,90	13,90	7,90	7,90	15,13	25,80	25,80	7,34	7,34
48	4,59	7,80	21,72	4,44	12,34	10,00	17,05	42,85	4,84	12,18
74	3,32	5,65	27,37	3,21	15,55	8,96	15,28	58,13	4,34	16,52
96	3,28	5,59	32,96	3,18	18,73	6,85	11,68	69,81	3,32	19,84
122	2,40	4,09	37,05	2,32	21,05	6,88	11,71	81,52	3,33	23,17
170	6,95	11,81	48,88	6,72	27,77	11,43	19,50	101,02	5,55	28,72
218	5,71	9,74	58,61	5,54	33,31	10,75	18,34	119,36	5,22	33,94
266	6,15	10,45	69,09	5,92	39,23	8,09	13,75	133,11	3,91	37,85
314	2,80	4,76	73,87	2,71	41,94	8,17	13,92	147,01	3,96	41,81

Tafel 34.

Analyse des wasserlöslichen Anteiles. Cystinbestimmung: Einwaage: 245,9 mg. Cystin: 4,96 mg = 2,02%.
Schwefelbestimmung: Einwaage: 627,4 mg. Bariumacetat: 5,14 ccm. Schwefel: 8,84 mg = 1,41%.
Stickstoffbestimmung: 168,8 (213,7) mg Einwaage. Stickstoff: 27,6 (34,5) mg = 16,35 (16,15) %.

Ansatz 5. Wolle 10 b. Der Versuch wurde nach 24 Stunden unterbrochen und die Anteile auf ihre Zusammensetzung untersucht. Einwaage: 19,2925 gr. Wolle. Cystingehalt: 11,48% = 2,215 gr. Cystin. Maximale H_2S-Ausbeute: 627,0 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 314,0 mg. Jodverbrauch: 37,07 ccm = 63,2 mg H_2S = 10,08%. HCl-Verbrauch: 8,90 ccm = 15,15 mg NH_3 = 4,84%.
Analyse des wasserlöslichen Anteiles. Cystinbestimmung: Einwaage: 285,9 mg. Cystin: 9,12 mg = 3,20%.
Schwefelbestimmung: Einwaage: 321,2 mg. Bariumacetat: 5,55 ccm. Schwefel: 9,55 mg = 2,97%.
Stickstoffbestimmung: Einwaage: 197,1 mg. Stickstoff: 31,35 mg = 15,90%.
Analyse des wasserunlöslichen Anteiles. Cystinbestimmung: Einwaage: 469,2 (608,4) mg. Cystin: 36,0 (49,5) mg = 7,69 (8,14) %.
Schwefelbestimmung: Einwaage: 523,8 (551,5) mg. Bariumacetat: 10,16 (10,72) ccm. Schwefel: 17,46 (18,45) mg = 3,34 (3,34) %.
Stickstoffbestimmung: Einwaage: 146,9 (168,3) mg. Stickstoff: 23,9 (27,4) mg = 16,27 (16,25) %.

Ansatz 6. Wolle 10 b. Der Versuch wurde nach 48 Stunden unterbrochen und die Anteile auf ihre Zusammensetzung untersucht. Einwaage: 13,9006 gr. Cystingehalt: 1,598 gr. Maximale H_2S-Ausbeute: 452,0 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 226,0 mg. Jodverbrauch: 28,68 ccm = 48,90 mg H_2S = 10,80% d. Th. HCl-Verbrauch: 24,02 ccm = 41,00 mg NH_3 = 18,15% d. Th.
Analyse des wasserlöslichen Anteiles. Cystinbestimmung: Einwaage: 216,6 mg. Cystin: 7,05 mg = 3,25%.

Schwefelbestimmung: Einwaage: 446,2 mg. Bariumacetat: 6,29 ccm. Schwefel: 10,8 mg = 2,42%.
Stickstoffbestimmung: Einwaage: 172,8 mg. Stickstoff: 26,95 mg = 15,62%.
Analyse des wasserunlöslichen Anteiles. Cystinbestimmung: Einwaage: 645,0 (470,0) mg. Cystin: 44,8 (33,0) mg = 6,95 (7,02) %.
Schwefelbestimmung: Einwaage: 586,0 mg (612,1 mg). Bariumacetat: 11,3 (11,75) ccm. Schwefel: 19,43 (20,2) mg = 3,32 (3,30) %.
Stickstoffbestimmung: Einwaage: 168,5 (178,1) mg. Stickstoff: 27,8 (26,2) mg = 15,6 (15,58) %.

Ansatz 7. Wolle 10 b. Der Versuch wurde nach 72 Stunden unterbrochen und die Anteile auf ihre Zusammensetzung untersucht. Einwaage: 13,1200 gr. Cystingehalt: 1,508 gr. Maximale H_2S-Ausbeute: 426,0 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 0,196 mg. Jodverbrauch: 37,89 ccm = 64,5 mg H_2S = 15,1%. HCl-Verbrauch: 25,41 ccm = 43,4 mg NH_3 = 22,1%.
Analyse des wasserlöslichen Anteiles. Cystinbestimmung: Einwaage: 266,8 mg. Cystin: 8,95 mg = 3,35%.
Schwefelbestimmung: Einwaage: 502,8 mg. Bariumacetat: 7,27 mg = 12,5 mg Schwefel = 2,49%.
Stickstoffbestimmung: Einwaage: 184,0 mg. Stickstoff: 28,81 mg = 15,68%.
Analyse des wasserunlöslichen Anteiles. Cystinbestimmung: Einwaage: 519,1 mg (543,2 mg). Cystin: 35,6 (35,2) mg = 6,86 (6,46) %.
Schwefelbestimmung: Einwaage: 649,2 mg (560,0 mg). Bariumacetat: 12,08 (10,40) ccm = 20,75 (17,90) mg. Schwefel = 3,20 (3,30) %.
Stickstoffbestimmung: Einwaage: 152,7 (166,6) mg. Stickstoff: 23,5 (26,0) mg = 15,4 (15,6) %.

Ansatz 8. Wolle 10 b. Der Versuch wurde nach 96 Stunden abgebrochen und die Anteile auf ihre Zusammensetzung untersucht. Einwaage: 11,3659 gr. Cystingehalt: 1,3000 gr. Maximale H_2S-Ausbeute: 368,0 mg. Maximale NH_3-Ausbeute: 161,0 mg. Jodverbrauch: 47,14 ccm = 80,4 mg H_2S = 21,85%.
Analyse des wasserlöslichen Anteiles. Cystinbestimmung. Einwaage: 227,8 mg. Cystin: 7,00 mg = 3,08%.
Schwefelbestimmung: Einwaage: 480,2 mg. Bariumacetat: 5,85 ccm = 10,08 mg Schwefel = 2,10%.
Stickstoffbestimmung: Einwaage: 169,3 mg. Stickstoff: 26,35 mg = 15,54%.
Analyse des wasserunlöslichen Anteiles. Cystinbestimmung: Einwaage: 453,5 (404,3) mg. Cystin: 28,8 (26,55) mg = 6,36 (6,56) %.
Schwefelbestimmung: Einwaage: 625,3 (502,6) mg. Bariumacetat: 11,09 (8,54) ccm = 19,09 (14,65) mg. Schwefel = 3,05 (2,92) %.
Stickstoffbestimmung: Einwaage: 132,9 (144,8) mg. Stickstoff: 21,2 mg (23,1 mg) = 15,95 (15,95) %.

Verdauung des wasserlöslichen Anteiles[55]). Der Spaltansatz mit 100 ccm enthielt: 0,9999 gr. Substanz lufttrocken, 5% Trypsin auf Substanzeinwaage bezogen. 3 ccm 0,1 m Kaliumbiphosphatlösung, 7 ccm 0,05 m Boraxlösung, mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt. Die Lösung ist damit auf p_H 8,4. Titriert wurde nach Willstätter-Waldschmidt-Leitz. Verdauungstemperatur 40° C. Titrationsprobe 10 ccm.
Blindversuch: 10 ccm Pufferlösung verbrauchen bei Anwesenheit der entsprechenden Menge Trypsin ohne Gegenwart der zu untersuchenden Substanz 1,52 ccm n/20 NaOH alkoholisch.
Verdauungsansätze: Entnommene Probe: 10 ccm.

Zeit in Stunden:	*Gesamttitration:*	*Titration abzgl. Blindwert:*	*Aciditätszuwachs in ccm n/20 NaOH:*
0	5,70 ccm	4,18 ccm	—
2	6,65 ccm	5,13 ccm	0,95
4	7,60 ccm	6,08 ccm	1,90
6	8,45 ccm	6,93 ccm	2,75
8	8,83 ccm	7,31 ccm	3,13
24	9,02 ccm	7,50 ccm	3,32

Tafel 35.

6. NACHWEIS VON SCHÄDIGUNGEN AN HAAREN UND WOLLEN.

Haar A (1): S-Bestimmung: Einwaage: 584,6 mg. Bariumacetat: 8,3 ccm. Schwefel: 14,28 mg = 2,34%. Cystinbestimmung: Einwaage: 457,6 mg. Cystin: 33,6 mg = 7,2%.
Haar U (2): S-Bestimmung: Einwaage: 635,4 mg. Bariumacetat: 9,83 ccm. Schwefel: 16,9 mg = 2,66%. Cystinbestimmung: Einwaage: 442,7 mg. Cystin: 42,4 mg = 9,57%.
Haar C (3): S-Bestimmung: Einwaage: 726,5 mg. Bariumacetat: 11,7 ccm. Schwefel: 20,25 mg = 2,79%. Cystinbestimmung: Einwaage: 598,9 mg. Cystin: 59,9 mg = 10,0%.
Haar D (4): S-Bestimmung: Einwaage: 701,7 mg. Bariumacetat: 8,53 ccm. Schwefel: 15,2 mg = 2,16%. Cystinbestimmung: Einwaage: 526,9 mg. Cystin: 24,0 mg = 4,56%.
Haar KN (5): S-Bestimmung: Einwaage: 725,2 mg. Bariumacetat: 13,26 ccm. Schwefel: 22,8 mg = 3,15%. Cystinbestimmung: Einwaage: 352,3 mg. Cystin: 36,3 mg = 10,3%.
Wolle C (6): S-Bestimmung: Einwaage: 457,9 mg. Bariumacetat: 7,28 ccm. Schwefel: 14,22 mg = 3,11%. Cystinbestimmung: Einwaage: 455,6 mg. Cystin: 44,1 mg = 9,66%.

---

[55]) Die Verdauungsversuche wurden von Herrn Dr. *Riederle* in der Fa. Kammgarnspinnerei Stöhr & Co. in Leipzig durchgeführt.

Wolle U (7): S-Bestimmung: Einwaage: 555,2 mg. Bariumacetat: 9,33 ccm. Schwefel: 16,05 mg = 2,89%. Cystinbestimmung: Einwaage: 322,4 mg. Cystin: 32,4 mg = 10,05%.

Wolle A (8): S-Bestimmung: Einwaage: 621,7 mg. Bariumacetat: 10,76 ccm. Schwefel: 18,15 mg = 2,98%. Cystinbestimmung: Einwaage: 348,9 mg. Cystin: 36,0 mg = 10,35%.

Wolle 9: S-Bestimmung: Einwaage: 524,1 mg. Bariumacetat: 9,75 ccm. Schwefel: 16,78 mg = 3,2%. Cystinbestimmung: Einwaage: 283,5 mg. Cystin: 31,5 mg = 11,1%.

Wolle 10: S-Bestimmung: Einwaage: 691,4 mg. Bariumacetat: 13,3 ccm. Schwefel: 22,9 mg = 3,31%. Cystinbestimmung: Einwaage: 342,4 mg Cystin: 37,2 mg = 10,85%.

Wolle 11: S-Bestimmung: Einwaage: 871,0 mg. Bariumacetat: 16,84 ccm. Schwefel: 29,0 mg = 3,33%. Cystinbestimmung: Einwaage: 363,4 mg. Cystin: 37,5 mg = 10,3%.

Wolle 12: S-Bestimmung: Einwaage: 829,8 mg. Bariumacetat: 15,15 ccm. Schwefel: 26,1 mg = 3,15%. Cystinbestimmung: Einwaage: 427,0 mg. Cystin: 43,8 mg = 10,25%.

Wolle 13: S-Bestimmung: Einwaage: 687,7 mg. Bariumacetat: 13,31 ccm. Schwefel: 22,9 mg = 3,33%. Cystinbestimmung: Einwaage: 446,7 mg. Cystin: 44,7 mg = 10,0%.

7. TRENNUNG UND ISOLIERUNG DER AMINOSÄUREN AUS SCHAFWOLLE.

274,0 gr. gereinigter, luftfeuchter Schafwolle (11 b) die 12,03% Wasser enthielt, also einem Trockengewicht von 241,0 gr. entsprachen, wurden in einem 5-l-Kolben mit 1100 ccm 25%iger Schwefelsäure übergossen und etwa 10 Stunden auf dem Wasserbad belassen, wobei völlige Lösung des Keratins eintritt. Nun erhitzte man 24 Stunden im Ölbad auf 125° C. Nach beendeter Hydrolyse verdünnte man auf 4 Liter und filtrierte von den Huminsubstanzen ab. Das Gewicht der im Hochvacuum getrockneten Huminsubstanzen betrug 5,8 gr. = 2,41% der trockenen Wolle. Ihr Stickstoffgehalt betrug 6,65%, was 0,386 gr. Stickstoff entsprach. Der Stickstoffgehalt der Lösung belief sich auf 39,55 gr., der Cystingehalt auf 19,88 gr. = 8,25%. Zu dem schwefelsauren Filtrat setzte man so lange Barytwasser, bis ein p_H-Wert von 3,8 erreicht war. Nun wurde von dem ausgefallenen Bariumsulfat abzentrifugiert und der Niederschlag 9 mal mit heißem Wasser ausgewaschen. Das Gesamtvolumen des Waschwassers betrug etwa 15 Liter. Dann engte man auf 5 Liter ein, wobei die Temperatur 30° C nicht überschritt, und entfernte die letzten Spuren von Schwefelsäure durch sorgfältige Zugabe von Baryt. Der Niederschlag wurde ebenfalls abzentrifugiert und wie oben gewaschen. In einem aliquoten Teil der Lösung führte man neuerdings eine Stickstoffbestimmung durch. Der Stickstoffgehalt betrug nach der Entfernung der Huminsubstanzen und der Schwefelsäure 37,8 gr. Das Bariumsulfat

enthielt 1,231 gr. Stickstoff. Der als Ammoniak vorliegende Stickstoff wurde mit 3,78 gr. ermittelt. Damit ergibt sich also folgende Übersicht über den Gesamtstickstoff:

Gesamtstickstoff	39,550 gr.	=	100,00%
Huminstickstoff	0,386 gr.	=	0,98%
$BaSO_4$-Stickstoff	1,231 gr.	=	3,12%
Ammoniakstickstoff	3,780 gr.	=	9,56%
Aminosäurestickstoff	34,153 gr.	=	86,34%

Auf den Aminosäurestickstoff werden im folgenden alle gefundenen Stickstoffmengen bezogen.

Bevor man zur Überführung in die Kupfersalze schritt, wurde das Gesamtammoniak entfernt. Zu diesem Zweck wurde die Lösung barytalkalisch gemacht und im Vacuum bei 40° C ein schwacher Luftstrom einige Stunden lang hindurchgesaugt. Der Endpunkt wurde mit *Neßlers* Reagens festgestellt. Nach der quantitativen Entfernung des Bariums engte man bei 30° C auf 3 Liter ein.

Überführung in die Kupfersalze. Die auf dem Wasserbade erhitzte Lösung wurde so lange mit Kupferkarbonat versetzt, bis die Gasentwicklung aufhörte. Dabei traten braunschwarze Flocken von Kupfersulfid auf, das durch Zersetzung eines Teiles des Cystins entstanden war. Das Reaktionsgemisch blieb noch einige Zeit bei 90° C stehen und wurde dann im Vacuum mit einem kleinen Überschuß an Kupferkarbonat zu einem zähen Syrup eingedampft. Der Rückstand wurde über Nacht mit 1,5 Liter kaltem Wasser auf der Schüttelmaschine belassen und nach dem Abfiltrieren und Waschen erneut eingedickt. Das Ganze wurde 3 mal wiederholt, wobei man nach jeder Filtration erneut einen kleinen Kupferkarbonatüberschuß zusetzte. Mit dieser Operation erzielte man die erste Trennung der Aminosäuren in wasserlösliche und wasserunlösliche Kupfersalze.

Die wasserunlöslichen Kupfersalze, die mit überschüssigem Kupferkarbonat vermischt waren und etwas Kupfersulfid enthielten, wurden in 15%iger Schwefelsäure gelöst und das Kupfer mit Schwefelwasserstoff abgeschieden. Der Kupfersulfidniederschlag wurde 5 mal mit je 1 Liter Schwefelwasserstoff 2 Stunden auf der Schüttelmaschine geschüttelt, um alle daran adsorbierten Aminosäuren in Lösung zu bringen. Nach dem Einengen auf etwa 3 Liter wurde die Schwefelsäure quantitativ mit Baryt entfernt und anschließend auf 500 ccm konzentriert. Der Stickstoffgehalt betrug 3,9 gr. Nachdem die Lösung durch Zusatz von Baryt auf p_H 10 gebracht worden war, wurde das Bariumsalz des Cystins und der Asparaginsäure durch Eingießen in 95%igem Äthylalkohol gefällt. Der Alkohol und die Bariumsalzlösung mußten mit Eis gekühlt sein, da sich sonst die Bariumsalze ölig abscheiden. Aus dem gleichen Grunde erfolgte die Zugabe portionsweise. Die abfiltrierten Bariumsalze wurden in Wasser ge-

löst, mit Schwefelsäure zersetzt und das abgeschiedene Bariumsulfat gründlichst mit heißem Wasser gewaschen. Das Gewicht der nach dem Eindampfen erhaltenen Trockensubstanz betrug 15,36 gr. mit einem Stickstoffgehalt von 1,689 gr. Die in dieser Probe ausgeführte Cystinbestimmung ergab 6,5 gr. Cystin, was einem Stickstoffgehalt von 0,758 gr. Stickstoff entspricht. Es verblieben also für 8,86 gr. Trockensubstanz 0,931 gr. Stickstoff. Dies ergab eine Aminosäure mit 10,5% Stickstoff, nämlich Asparaginsäure (ber. 10,53).

Die alkoholische Lösung der Bariumsalze wurde mit Schwefelsäure von überschüssigem Barium befreit und ebenfalls zur Trockene eingeengt. Der verbleibende Rückstand wog 20,7 gr. bei einem Stickstoffgehalt von 2,22 gr. Der Cystingehalt betrug 0,69 gr = 0,08 gr. Stickstoff, so daß für den Rest von 20,01 gr. 2,14 gr. Stickstoff verbleiben, was einem Gehalt von 10,70% N entspricht und mit Leucin (ber. 10,69% N) übereinstimmt.

Cystin	0,837 gr. N	=	2,47%
Asparaginsäure	0,931 gr. N	=	2,71%
Leucin	2,140 gr. N	=	6,27%

Die wasserlöslichen Kupfersalze wurden im Vacuum so weit wie möglich zur Trockene eingeengt und der verbleibende Syrup 10 mal mit je einem Liter absolutem Aceton durchgerührt, wobei er in ein feines, körniges Pulver zerfiel. Die auf diese Weise von aller Feuchtigkeit befreiten Kupfersalze wurden anschließend über Nacht im Vacuum bei gewöhnlicher Temperatur und dann ½ Stunde bei 105° C getrocknet. Das nunmehr staubfeine Pulver wurde nun 8 mal mit je einem Liter abs. Methylalkohol 2 Stunden auf der Schüttelmaschine ausgelaugt, wobei vor jeder Alkoholerneuerung scharf abgesaugt wird. Die beiden Fraktionen, methylalkohollösliche und methylalkoholunlösliche Kupfersalze, werden nun getrennt aufgearbeitet.

Die methylalkoholunlöslichen Kupfersalze stellen den Hauptanteil dar. Nach dem Lösen in Wasser, wobei ein kleiner Teil ungelöst blieb, der mit den wasserunlöslichen Kupfersalzen vereinigt wurde, entfernte man das Kupfer durch Fällen in neutraler Lösung mit Schwefelwasserstoff. Das verbleibende Kupfersulfid wird 5 mal mit schwefelwasserstoffhaltiger, verdünnter Schwefelsäure ausgeschüttelt, um vor allem das schwer lösliche Tyrosin zu entfernen. Der Gesamtstickstoff der methylalkoholunlöslichen Kupfersalze betrug 24,8 gr. Nach dem Fällen der Schwefelsäure mit Baryt engte man die Aminosäurelösung auf 500 ccm ein. Dabei fiel bereits ein Teil des Tyrosins in weißen, glänzenden Nädelchen aus, die abfiltriert wurden. Nach Zusatz der zur Bildung der Bariumsalze notwendigen Barytmenge goß man die eiskalte Lösung in eiskalten, 95%igen Alkohol portionsweise ein, wobei das Bariumsalz der Glutaminsäure ausfiel. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit Alkohol gewaschen. Das Bariumsalz der Glutaminsäure wurde mit Schwefelsäure zersetzt und nach der Filtration samt den Waschwässern zur Trockene verdampft. Der Trocken-

rückstand, den man mit Aceton durchrührte, wog 61 gr. mit einem Stickstoffgehalt von 6,3 gr.

Die alkohollöslichen Bariumsalze werden mit Schwefelsäure von Barium befreit und zur Entfernung des Alkohols mehrmals mit Wasser auf ein kleines Volumen konzentriert. Dabei fiel eine weitere Menge von Tyrosin aus, die mit der 1. vereinigt 4,8 gr. ausmachte mit einem Stickstoffgehalt von 0,374 gr. Die in Lösung verbleibenden Aminosäuren enthielten 16,3 gr. Stickstoff. Das p_H der Lösung betrug 9,5.

Der 4. Teil der Lösung wurde zur Bestimmung des Lysins[56]) abgetrennt und darin unter Zusatz von Bariumhydroxyd das Arginin und Histidin mit Silbernitrat gefällt. Nach der Entfernung des Bariums mit Schwefelsäure und des Silbers mit Schwefelwasserstoff, fällte man das Lysin in der Hitze mit Phosphorwolframsäure. Nach 3tägigem Stehen in Eis wurde der reichliche Niederschlag abgenutscht und in schwefelsaurer Lösung mit Amylalkohol-Äther, dem etwas Alkohol zugesetzt war, zersetzt. Nach erschöpfender Extraktion mit Amylalkohol-Äther (1 Liter Lösungsmittel) wurde auf ein kleines Volumen eingeengt, die Schwefelsäure quantitativ mit Baryt entfernt und auf 25 ccm konzentriert. Das p_H der Lösung ist >10. Das Lysin wurde durch Zugabe von 10 gr. Pikrinsäure in 100 ccm abs. Alkohol gefällt, nachdem man vorher so viel abs. Alkohol zugegeben hatte, daß eine Trübung bestehen blieb. Nach 3tägigem Stehen im Eisschrank wurde das in gelben Nädelchen auskristallisierende Pikrat des Lysins abfiltriert. Die auf das Gesamthydrolysat bezogene Gewichtsmenge beträgt 22,4 gr. Pikrat, was 8,6 gr. Lysin mit 1,65 gr. Stickstoff entspricht.

Die restlichen $^3/_4$ der Aminosäurelösung wurden durch Zusatz von frisch gefälltem, überschüssigem Zinkhydroxyd in der Siedehitze in die Zinksalze übergeführt. Das überschüssige Zinkhydroxyd wurde abfitriert und in der verbleibenden Lösung das Histidin durch Zusatz von $HgCl_2$ gefällt, wobei der Endpunkt der Fällung genau eingehalten werden muß. Nach mehrtägigem Stehen wurde der Niederschlag abgesaugt, kurz gewaschen und in schwefelsaurer Lösung mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Chlor entfernte man mit Silbersulfat, das Silber mit Schwefelwasserstoff in saurer, das Zink in barytalkalischer Lösung. Nachdem die Lösung frei von Baryt und Schwefelsäure war, wurde im Vacuum zur Trockene eingeengt. Das Gewicht der Trockensubstanz betrug 18,1 gr. mit 3,22 gr. Stickstoff, also einem für Histidin zu kleinen Stickstoffwert. Eine Prüfung auf Cystin verlief negativ. Mit Flaviansäure entstand ein oranger Niederschlag, der sich als Argininflavianat erwies. Eine Argininbestimmung im Trockenrückstand nach Kossel und Staud[57]) ergab 21,2% Arginin. Eine Histidinbestimmung nach Kapeller-Adler[58]) ergab 8,5% Histidin. Die

---

[56]) Vgl. *Bergmann* und *Niemann,* J. biol. Chem. 122, 577 (1938).
[57]) *Kossel* und *Staud,* H. 156, 270 (1926).
[58]) *Kapeller-Adler, Haas,* Biozt. 280, 232 (1935).

Verteilung des Arginins, Histidins und der Restsubstanz, deren Zusammensetzung nicht weiter untersucht wurde, zeigt also folgendes Bild:

Trockenrückstand:	18,10 gr. mit 3,220 gr. N
Arginin:	3,84 gr. mit 1,235 gr. N
Histidin:	1,54 gr. mit 0,415 gr. N
Trockenrückstand nach Abtrennen des Histidins und Arginins:	10,52 gr. mit 1,570 gr. N

Der Rückstand gab mit Phosphorwolframsäure eine Fällung, nach deren Entfernung die Lösung noch auf die Diazoreaktion ansprach, was das Vorhandensein des Tyrosins wahrscheinlich machte. Dies ließ sich aber mit der Wasserlöslichkeit nicht vereinbaren.

Die Zinksalze des Arginins, Lysins, Alanins und Glykokolls, die in Lösung verblieben, wurden von Chlorionen mit Silbersulfat, von Silber, Quecksilber und Zink mit Schwefelwasserstoff befreit und die SO_4-Ionen mit Baryt gefällt. Nach der Konzentration der Lösung auf 500 ccm setzte man 40 gr. Flaviansäure zu, die in 0,5%iger Schwefelsäure gelöst war und ließ 3 Tage in Eis stehen. Der abfiltrierte, mit flaviansäurehaltigem Wasser gewaschene Niederschlag wurde im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet und wog 43,1 gr.

Das Filtrat wurde in schwefelsaurer Lösung 36 Stunden mit Butylalkohl extrahiert, wodurch alle Flaviansäure entfernt wurde. Die flaviansäurefreie Lösung enthielt noch Lysin, Glykokoll und Alanin, die nicht mehr getrennt wurden. Cystin ließ sich nicht mehr nachweisen. Der Stickstoffgehalt beträgt 3,72 gr., wobei 1,24 gr. auf das in dieser Probe noch nicht abgetrennte Lysin entfallen. Also verblieben für Glycin und Alanin 2,48 gr. Stickstoff.

Das Gesamtbild der in Methylalkohol unlöslichen Kupfersalze der Aminosäuren: Glutaminsäure, Tyrosin, Histidin, Arginin, Lysin, Alanin + Glycin gestaltet sich also unter Bezug auf das Gesamthydrolysat folgendermaßen:

Glutaminsäure	6,500 gr. N	=	19,00%
Tyrosin	0,372 gr. N	=	1,09%
Arginin	8,680 gr. N	=	25,40%
Histidin	0,548 gr. N	=	1,61%
Lysin	1,650 gr. N	=	4,84%
Alanin + Glycin	3,310 gr. N	=	9,70%
Histidinfraktion	3,092 gr. N	=	8,48%

Die methylalkohollöslichen Kupfersalze werden zur Trockene eingeengt, wiederholt in Methylalkohol gelöst und der nicht gelöste Anteil mit den methylalkoholunlöslichen Kupfersalzen aufgearbeitet. Nach der Entfernung des Kupfers mit Schwefelwasserstoff werden die freien Aminosäuren zur Trockene eingedampft und mit abs. Aceton granuliert. Durch

Extraktion mit abs. Äthylalkohol lassen sich die freien Aminosäuren aufteilen in alkohollösliche (Prolin, Aminosäuren, deren Zusammensetzung nicht näher untersucht wurde) und alkoholunlösliche (Valin).

Die alkoholunlösliche Fraktion stellte reines Valin dar, in einer Ausbeute von 7,5 gr. Stickstoffgehalt 11,55% (ber. 11,96% N).

Die alkohollösliche Fraktion (500 ccm) wurde mit der dem Nichtaminostickstoff äquivalenten Menge Pikrinsäure versetzt und auf dem Wasserbad auf 50 ccm eingeengt. Nach 2tägigem Stehen wurde das ausgefallene Prolinpikrat abgesaugt und mit Äther gewaschen. Die im Filtrat gelösten Pikrate zersetzte man mit Schwefelsäure, wobei ein Teil der Pikrinsäure kristallin ausfiel, sich aber bei der kontinuierlichen Extraktion mit Äther samt der in Lösung verbleibenden Pikrinsäure entfernen ließ. Das als Pikrat in Anbetracht der Fremdpikrate nicht kristallisierende Prolin wurde in der von Pikrinsäure befreiten absolut alkoholischen Lösung mit $CdCl_2$ in 90%igem Alkohol gefällt und nach dem Entfernen des Chlors mit Silbersulfat und des Silbers und Cadmiums mit Schwefelwasserstoff in SO_4-freier Lösung in das Pikrat übergeführt, das nun einwandfrei in Nadeln auskristallisierte. Die Gesamtausbeute an Prolinpikrat betrug 29,0 gr. mit einem Prolinstickstoff von 1,19 gr.

Das Filtrat der $CdCl_2$-Fällung wurde von Chlor, Silber, Cadmium und SO_4 befreit und erneut in das Kupfersalz übergeführt. Der in Methylalkohol unlösliche Teil wurde mit den anderen methylalkoholunlöslichen Kupfersalzen vereinigt. Nach der Entfernung des Kupfers betrug der Stickstoffgehalt der freien Aminosäuren 3,99 gr., der nahezu ausschließlich als Nichtaminostickstoff vorliegt. Auf eine weitere Trennung wurde verzichtet. Die methylalkoholöslichen Kupfersalze zeigen folgende Übersicht:

Valin	0,777 gr. N	=	2,31%
Prolin	1,190 gr. N	=	3,48%
Rest	3,990 gr. N	=	11,70%.

Vorliegende Arbeit wurde am Chemischen Institut der Universität Würzburg auf Veranlassung und unter Leitung von Herrn Dozent Dr. A. *Schöberl* in der Zeit vom Mai 1937 bis November 1938 ausgeführt.

Es ist mir eine angenehme Pflicht meinem verehrten Lehrer Herrn Dr. A. *Schöberl* für seine tatkräftige Unterstützung und die vielen Anregungen während meiner Arbeit, sowie für das mir in größtem Umfange entgegengebrachte Wohlwollen meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

LEBENSLAUF.

Ich, *Paul Rambacher,* wurde am 18. April 1915 zu Würzburg als Sohn des Monteurs Matthäus Rambacher und seiner Ehefrau Babette Rambacher, geb. Günther, geboren. Vom 6. bis zum 10. Lebensjahre besuchte ich die Volkshauptschule Würzburg, um anschließend in die Kreisoberrealschule des gleichen Ortes überzutreten. Dort legte ich nach neunjährigem Besuch im Februar und März d. J. 1934 die Reifeprüfung ab und erwarb gleichzeitig die Zulassung zur Hochschule. Anschließend diente ich im freiwilligen Arbeitsdienst bis November 1934, um alsdann an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg mit dem Studium der Chemie zu beginnen. An der gleichen Hochschule legte ich am 15. Februar 1936 mein erstes und am 15. April 1937 mein zweites Verbandsexamen ab. Im Sommersemester 1936 war ich im Chemischen Praktikum für Mediziner und im anschließenden Wintersemester im anorganisch-chemischen Praktikum bis heute mit einer Assistentenstelle betraut. Vom Mai 1937 bis November 1938 beschäftigte ich mich mit der Anfertigung vorliegender Arbeit.